

EINFLUSS VON HYPERTHERMIE, MITOMYCIN C UND
MAGNETISCHEN EISENOXIDNANOPARTIKELN
AUF DIE EXPRESSION DER
MULTIDRUG RESISTANCE ASSOZIIERTEN PROTEINE
MRP 1 UND MRP 3 *IN VITRO*

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Karolin Franke geboren am 29.06.1987 in Saalfeld/Saale

Gutachter

1. Prof. Dr. rer. biol. hum. habil. Ingrid Hilger, Jena
2. Prof. Dr. med. habil. Dietmar Gottschild, Jena
3. PD Dr. med. habil. Stefan Pfeleiderer, Bremerhaven

Tag der öffentlichen Verteidigung: 13.11.2013

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AA/BAA	Acrylamid/ Bisacrylamid
ABC	ATP-bindende Cassette
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser) mit einem Widerstands- wert von 0,055 Ω
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein (ABC G2)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
Da	Dalton
(c)DNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	desoxy Nukleotid-Tri-Phosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	eukaryoter Initiationsfaktor
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fe	Eisen
FITC	Fluoresceinisoithiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenzlicht
FS	Vörwärtsscatter (Foreward Scatter)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Hank's BSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
IgG	Immunoglobulin G
kb	Kilobasen
M	molare Masse (g/mol)
MDR	Multidrug Resistance
MRP	Multidrug Resistance assoziierte Proteine
MRT	Magnetresonanztomografie
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethylphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, innert salt
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat), reduzierte Form
NBD	Nukleotidbindende Domäne
ORE	oxidative responsive element
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
(RT-)PCR	(reverse transcription-) polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	Radioimmunpräzitationspuffer-Ansatz
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Upm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SS	Seitwärtsscatter (Sideward Scatter)
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
3	Zielstellung	13
4	Material und Methoden	15
4.1	Verwendete Geräte und sonstige Materialien	15
4.2	Chemikalien, Antikörper, Primer und kommerziell erworbene Kits.....	18
4.3	Puffer, Lösungen und Medien	22
4.4	Zellkultur	26
4.4.1	Verwendete Zelllinien	26
4.4.1.1	MCF-7-Zellen	26
4.4.1.2	BT-474-Zellen.....	27
4.4.2	Auftauen kryokonservierter Zellen.....	27
4.4.3	Kultivierung von Zellen.....	27
4.4.4	Passagieren von Zellen	28
4.4.5	Zellzahlbestimmung mittels CASY-Zellzähler	29
4.4.6	Kryokonservierung von Zellen	30
4.5	Durchflusszytometrie.....	30
4.6	Nachweis von MRP1 und MRP3 auf RNA-Ebene	34
4.6.1	Optimierung der RNA-Isolation aus MCF-7- und BT-474-Zellen.....	34
4.6.1.1	Isolation von RNA mittels Trizol [®] -Reagent	34
4.6.1.2	Isolation von RNA mittels High Pure Isolation Kit.....	35
4.6.2	Reverse Transkription.....	35

4.6.3	RT-PCR	36
4.6.4	Agarose-Gelelektrophorese	38
4.7	Nachweis von MRP1 und MRP3 auf Proteinebene	38
4.7.1	Optimierung der Gesamt- und Membranproteinisolation aus MCF-7- und BT-474-Zellen	39
4.7.1.1	Gesamtproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels RIPA-Lysepuffer ..	39
4.7.1.2	Membranproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit	39
4.7.1.3	Membranproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit	40
4.7.1.4	Membranproteinextraktion mittels Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation	41
4.7.1.5	Detergentienbasierte Membranproteinextraktion.....	42
4.7.2	Vergleich der Gesamt- und Membranproteinbestimmung aus MCF-7- und BT-474-Zellen	43
4.7.2.1	Bestimmung des Gesamtproteingehalts mit der Methode nach Bradford	43
4.7.2.2	Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels quantiPro-BCA-Assay	44
4.7.2.3	Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels NanoDrop	44
4.7.3	Optimierung der SDS-PAGE.....	45
4.7.4	Optimierung des Western-Blottings	47
4.7.5	Optimierung des spezifischen Nachweises von MRP 1 und MRP 3 mittels Immunoblotting	48
4.8	Untersuchung des Einflusses von Hyperthermiebehandlung, Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 <i>in vitro</i>	51
4.9	Untersuchung des Einflusses von Hyperthermiebehandlung, Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Vitalität von BT-474-Zellen	56
4.10	Statistische Auswertung	57

5	Ergebnisse.....	59
5.1	Nachweis der Expression von MRP 1 und MRP 3 in den humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und BT-474 mittels Durchflusszytometrie.....	59
5.2	Optimierungen	59
5.2.1	Optimierung der RNA-Isolation aus MCF-7-Zellen	60
5.2.2	Optimierung der Gesamt- und Membranproteinisolation aus MCF-7-Zellen	60
5.2.2.1	Gesamtproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels RIPA-Lysepuffer ..	61
5.2.2.2	Membranproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit und Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit	61
5.2.2.3	Membranproteinextraktion mittels Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation	62
5.2.2.4	Detergentienbasierte Membranproteinextraktion.....	64
5.2.3	Vergleich der Gesamt- und Membranproteinbestimmung aus MCF-7-Zellen	64
5.2.4	Optimierung der SDS-PAGE.....	66
5.2.5	Optimierung des spezifischen Nachweises von MRP 1 und MRP 3 in MCF-7-Zellen mittels Immunoblotting	67
5.3	Einfluss Hyperthermie auf die Expression von MRP1 und MRP3 <i>in vitro</i>	69
5.4	Einfluss von Mitomycin C allein und in Kombination mit Hyperthermie auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 <i>in vitro</i>	73
5.5	Einfluss von magnetischen Eisenoxidnanopartikeln allein und in Kombination mit Hyperthermie auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 <i>in vitro</i>	78
5.6	Einfluss der Kombination von Hyperthermiebehandlung, Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 <i>in vitro</i>	81
5.7	Einfluss der Kombination von magnetischen Nanopartikeln, Mitomycin C und Hyperthermie auf die Vitalität von BT-474-Zellen	84

6	Diskussion.....	86
6.1	Optimierung des Nachweises von MRP1 auf RNA- und Proteinebene	86
6.2	Einfluss von Hyperthermie, Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und 3 <i>in vitro</i>	88
7	Schlussfolgerungen	102
8	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	103
9	Anhang.....	109
9.1	Tabellen.....	109
9.2	Danksagung	110
9.3	Lebenslauf.....	111
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	112

1 Zusammenfassung

FRAGESTELLUNG Bei der Brustkrebstherapie stehen der guten Effektivität der momentan standardmäßig durchgeführten Kombinationstherapie aus Operation und adjuvanter Radiotherapie hohe Morbiditätsraten und schlechte kosmetische Resultate gegenüber. Eine viel versprechende minimal-invasive Behandlungsoption stellt die multivalente magnetische Wärmebehandlung dar. Grundlage dieser Therapie ist die Applikation von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln, die zu einer selektiven Erwärmung und damit zur Zerstörung des Tumors führen. Durch Kopplung von Chemotherapeutika an die Nanopartikel wird es gleichzeitig möglich, Chemotherapeutika im Tumor bei geringer systemischer Beteiligung zu konzentrieren und damit den Tumor multivalent zu bekämpfen. Problematisch bei der Chemotherapie ist die Entwicklung einer Multidrug-Resistance (MDR). Für über 90% des chemotherapieassoziierten Therapieversagens bei Brustkrebs werden die am Chemotherapeutikaefflux beteiligten MDR-Proteine verantwortlich gemacht. Ob die Expression dieser Proteine durch eine magnetische Wärmebehandlung in Kombination mit Chemotherapie beeinflusst wird und damit dem Erfolg dieser Therapieform entgegensteht, ist nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, inwieweit die multivalente magnetische Wärmebehandlung die Expression des ubiquitär exprimierten MRP 1 und des in resistenten Brustkrebszellen stark hochregulierten MRP 3 *in vitro* beeinflusst.

METHODEN Der *in vitro*-Nachweis von MRP 1 und 3 erfolgte auf RNA-Ebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und Immunoblotting in den humanen Adenokarzinomzelllinien MCF-7 und BT-474. Zur Untersuchung des Hyperthermieeinflusses auf die Expression von MRP 1 und 3 wurden BT-474-Zellen für 15 bis 120 min bei 43 °C im Brutschrank und einer Postinkubationszeit von 0 bis 48 h bei 37°C behandelt. Die chemotherapeutische Behandlung von BT-474-Zellen erfolgte mit 0,15 und 1,5 µg Mitomycin C (MMC) pro cm² Wachstumsfläche für 24 h und einer Postinkubationszeit von 0 und 24 h, sowie in Kombination mit Hyperthermie (HT) bei 43 °C von 90 min vor bzw. 60 min nach der MMC-Behandlung. Der Einfluss von magnetischen, dextranumhüllten Eisenoxidnanopartikeln (MNP) auf die Expression von MRP 1 und 3 wurde in den Konzentrationen 1,5, 15 und 150 µg Fe/cm² Wachstumsfläche in An- und Abwesenheit einer 60 bzw. 90minütigen HT im Anschluss an eine 24stündige Partikelinkubation untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss dieser MNP-Konzentrationen in Kombination mit einer 24stündigen Behandlung mit 1,5 µg/cm² MMC im Anschluss an die 24stündige Partikelinkubation in An- und Abwesenheit einer 90minütigen HT untersucht. Die

Bestimmung der Vitalität von BT-474-Zellen nach Behandlung mit MMC und MNP in An- und Abwesenheit von 15 bzw. 90 min HT bei 43 °C erfolgte mittels MTS-Test.

ERGEBNISSE In BT-474-Zellen wurde eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Proteinexpression von MRP 1 und MRP 3 als in MCF-7-Zellen gefunden. Direkt nach der HT-Behandlung von BT-474-Zellen für 15 und 30 min wurde eine Steigerung der Proteinexpression von MRP 1 beobachtet, die nach 2 bis 48 h nicht mehr detektierbar war. Eine HT-Behandlung für 90 bis 120 min führte im Postinkubationszeitraum von 0 bis 48 h zu einer Verminderung der Proteinexpression von MRP 1 und 3 auf unter 50% des Kontrollniveaus, während eine HT von 60 min zu einer geringeren Abnahme führte. Auf RNA-Ebene wurden nach HT für MRP 1 und 3 keine Expressionsänderungen gefunden. Die Behandlung mit 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ MMC führte zu keiner Änderung der MRP 1 und 3 Proteinexpression, während in Kombination mit 60 und 90 min HT eine Abnahme auf weniger als 50% des Kontrollniveaus beobachtet wurde. Durch eine Behandlung mit 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ MMC wurde eine starke Abnahme von MRP 1 und eine moderate Abnahme von MRP 3 beobachtet, die sich nach weiteren 24 h Postinkubationszeit verstärkte. Diese Effekte wurden in Kombination mit 60 und 90 min HT verstärkt. Infolge der 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ MMC-Behandlung zeigte sich keine Änderung der RNA-Expression von MRP 3, während es zu einer deutlichen Abnahme von MRP 1 kam. Nach der Behandlung mit MNP wurde eine Zunahme der Expression von MRP 1 mit steigender Partikelkonzentration beobachtet. In Kombination mit 60 min HT sank die Expression von MRP 1 auf Kontrollniveau, während durch eine 90minütige HT eine mit zunehmender Partikelkonzentration stärker werdende Abnahme beobachtet wurde. Für MRP 3 wurde durch die MNP eine moderate, partikelkonzentrationsunabhängige Steigerung beobachtet, die in Kombination mit 60 und 90 min HT aufgehoben wurde. Nach kombinierter Behandlung mit MNP und MMC konnte eine Abnahme von MRP 1 und 3 auf Proteinebene gezeigt werden, die von der inkubierten Partikelkonzentration und den hyperthermen Bedingungen unabhängig war, während auf RNA-Ebene für MRP 1 und 3 keine Änderung festgestellt wurde. Die vitalitätseinschränkende Wirkung von MMC wurde durch HT und/oder MNP nicht beeinflusst.

SCHLUSSFOLGERUNGEN Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass durch die Kombination von MMC bzw. MNP mit HT eine deutlich stärkere Abnahme von MRP 1 bzw. 3 als bei alleiniger Gabe erreicht werden kann. Damit kann mit der magnetischen HT nicht nur die Hoffnung der zielgerichteten Erwärmung und selektiven chemotherapeutischen Behandlung von Tumorgewebe verknüpft werden, sondern auch eine Chance gegeben werden, die MDR zu überwinden und so Chemotherapeutika möglicherweise effektiver und zielgerichteter einzusetzen.

2 Einleitung

Bereits 1866 erkannte man, dass das Krebswachstum gehemmt werden kann, wenn Tumoren einer Temperatur von über 42 °C ausgesetzt werden (Hager 2003). Seit den 1980er Jahren wurden, bedingt durch den technischen Fortschritt der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts, verstärkt Untersuchungen zum Einsatz von Thermotherapie zur Behandlung von Krebserkrankungen gemacht (Hager 2003), so dass der Weg für eine so genannte minimal invasive Therapieoption geebnet wurde. Durch die Behandlung maligner Erkrankungen mit Wärme (Hyperthermie und Thermoablation) bzw. Kälte (Kryoablation) ist eine Möglichkeit gegeben, die Stärken der klassischen Therapieverfahren maligner Erkrankungen zu unterstützen und ihre Limitationen zu überwinden.

In der Wärmetherapie unterscheidet man zwischen Thermoablation und Hyperthermie. Bei der Hyperthermiebehandlung handelt es sich um eine selektive Erwärmung des tumortragenden Gewebes auf 40 – 47 °C mittels Ganzkörper- oder lokaler Hyperthermie (Schlemmer et al. 2004, Roti Roti 2008). Für die klinische Hyperthermiebehandlung werden in der Regel Temperaturen unter 43 °C sowie wiederholte Wärmebehandlungen eingesetzt, was bedingt, dass nur ein begrenzt zellschädigendes Potential erreicht werden kann. Tumorremissionen von bis zu 50 % werden nach ausschließlicher Hyperthermiebehandlung beobachtet (Roti Roti 2008, Hilger et al. 2005), weshalb hypertherme Behandlungen nicht als alleiniges Verfahren, sondern als Bestandteil einer multimodalen Tumorthherapie durchgeführt werden. Die Dauer der hyperthermen Behandlung variiert in der Klinik zwischen 60 (Wust et al. 2002, Hegewisch-Becker et al. 2002) und 120 Minuten (van der Zee 2002, Schlemmer et al. 2004). *In vitro* Untersuchungen liegen für eine Dauer von 30 (Mohamed et al. 2006, Takemoto et al. 2003), 60 (Bergs et al. 2007, van der Heijden et al. 2005) und 90 Minuten (Mohamed et al. 2006) vor. Im Gegensatz zur Hyperthermie versteht man unter Thermoablation die Behandlung von Tumorarealen mit Temperaturen von über 50 °C für wenige Sekunden bis Minuten mit dem Ziel der Induktion von Koagulationsnekrosen (Hilger et al. 2005). Innerhalb kurzer Zeit wird der Tumor durch Temperaturen über 50 °C vollständig zerstört (Clasen et al. 2007). Die Thermoablation umfasst Radiofrequenzablation, laserinduzierte Thermotherapie, hochintensiven fokussierten Ultraschall, Mikrowellenablation (Mahnken et al. 2008), Kryotherapie und die magnetische Wärmebehandlung (Clasen et al. 2007, Esser et al. 2007, Hilger et al. 2005). Thermoablative Verfahren werden bei umschriebenen Tumormanifestationen angewandt, wenn chirurgische, chemotherapeutische

oder strahlentherapeutische Interventionen bei alleinigem Einsatz kein ausreichend gutes Ergebnis erzielen. Bei der Radiofrequenzablation kommt es durch hochfrequente Wechselströme (375-500 kHz) zu Ionenbewegungen, durch die Friktionswärme entsteht, die die Grundlage für die Induktion von Koagulationen ist (Clasen und Pereira 2007, van Esser et al. 2007). Die Radiofrequenzablation ist aufgrund der geringen therapieassoziierten Morbidität ein etabliertes Verfahren bei Osteoidsarkomen, bei umschriebenen, schwer operablen Tumoren von Leber, Lunge und Nieren, sowie zur symptomatischen Behandlung von Knochen- und Weichteiltumoren (Clasen und Pereira 2007). Bei der Laserinduzierten Thermotherapie werden durch Photonenabsorption die Tumorzellen auf Temperaturen von mindestens 60°C erhitzt, was ab einer Einwirkdauer von 10 min zu irreversiblen Zellschäden führt (Hosten et al. 2003). Aufgrund des hohen apparativen Aufwandes und der damit verbundenen Kosten wird dieses Verfahren in nur wenigen Zentren angewendet (Kennedy et al. 2003, Schlemmer et al. 2004). Beim hochintensiven fokussierten Ultraschall werden im Tumor durch Fokussierung hochfrequenten Ultraschalls mit einer Eindringtiefe von bis zu 20 cm innerhalb weniger Sekunden Temperaturen von über 80 °C erreicht. Trotz ermutigender Ergebnisse bei Brust-, Leber- und Knochentumoren wird dieses Verfahren lediglich vereinzelt beim Prostatakarzinom angewendet (Mahnken et al. 2008), da eine lange Behandlungsdauer (120 min) erforderlich ist (Esser et al. 2007). Die Mikrowellenablation befindet sich in einer frühen klinischen Phase und wird bisher vornehmlich zur Behandlung kleiner Leberkarzinome eingesetzt (Mahnken et al. 2008). Eine Sonderform der thermoablativen Verfahren stellt die Kryotherapie dar. Bei der Kryoablation werden Temperaturen von -40 °C im Tumorkern durch Implantation von mit flüssigem Stickstoff bzw. Argongas gefüllten Kryoprobes erreicht. Durch die Bildung von intrazellulären Eiskristallen werden die Tumorzellen direkt zerstört. Ferner kommt es durch osmotische Veränderungen zum Wasserausstrom aus der Zelle, was in der Folge zur mechanischen Destruktion der Zellen führt (van Esser et al. 2007). So kann eine Infiltration von Entzündungszellen und eine Koagulationsnekrose erreicht werden (Baust et al. 2009). Anwendung findet dieses Verfahren ausschließlich in der Therapie kleiner Nierentumoren (Mahnken et al. 2008).

Für die beschriebenen thermoablativen Verfahren ist es in der Klinik bis heute nicht gelungen, die Erwärmung auf das Tumorgewebe zu beschränken. Durch den Wärmeabtransport ins umliegende Gewebe wird auch dieses geschädigt, während im Tumor selbst die gewünschte Temperatur nicht gehalten werden kann. Ferner kann mit den bisher beschriebenen Methoden keine einheitliche Temperaturverteilung im Tumor gesichert werden und die entsprechenden Applikatoren müssen stets invasiv in den Tumor eingebracht werden (Cherukuri et al. 2010),

was die Gefahr der Verschleppung von Tumorgewebe erhöht. Außerdem besteht keine ausreichend sichere Möglichkeit, die Temperatur nicht invasiv zu überwachen. Eine Möglichkeit diese Limitationen zu überwinden, stellt der Einsatz von magnetischen Nanopartikeln zur selektiven Erwärmung des Tumorgewebes dar. Diese kleinen, magnetischen Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 50 – 200 nm werden seit den 1980er Jahren in vielen biomedizinischen Anwendungsgebieten genutzt (Latorre und Rinaldi 2009).

Werden magnetische Nanopartikel einem Magnetwechselfeld ausgesetzt, so findet aufgrund verschiedener Verlustmechanismen während der Ummagnetisierung des Materials eine Erwärmung der Partikel statt, die auf das umliegende Tumorgewebe übertragen wird. Dabei stehen vor allem zwei Mechanismen im Vordergrund: Néel'sche und Brown'sche Verluste (Hilger et al. 2005). Aufgrund des alternierenden Magnetfeldes führen die Partikel Rotations- und Oszillationsbewegungen aus, wobei Reibungsenergie in Form von Wärme frei wird (Brown'sche Verluste). Von Néel'schen Verlusten spricht man, wenn durch das Wechselfeld die Magnetisierung der Teilchen gedreht wird und es durch irreversible Prozesse im Inneren der Teilchen zur Erwärmung kommt (siehe Abbildung 1).

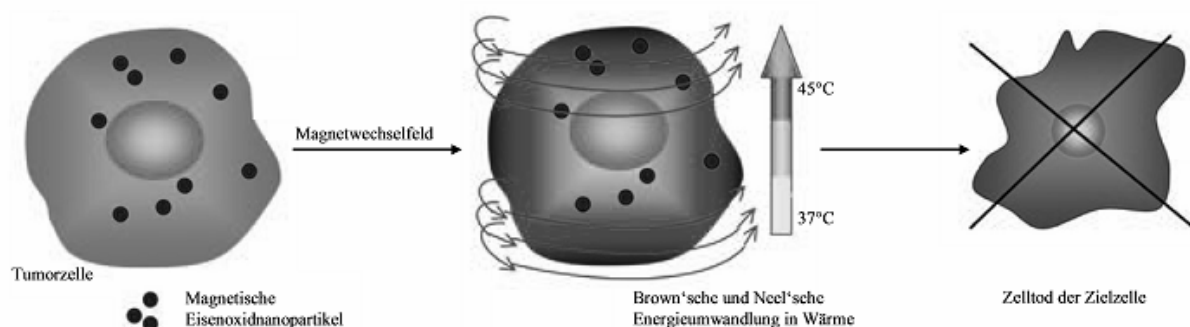


Abbildung 1: Schematische Darstellung der magnetischen Hyperthermie. Durch die Injektion magnetischer Nanopartikel in den Tumor kommt es nach Anlegen eines alternierenden Magnetfeldes durch Ummagnetisierungsprozesse zur selektiven Erwärmung und folglich zum Untergang der Zielzelle (modifiziert nach Latorre und Rinaldi 2009)

Die magnetischen Nanopartikel können über verschiedene Wege in den Tumor appliziert werden. Eine Möglichkeit stellt die direkte intratumorale Injektion dar. Mit dieser Methode können Eisenoxidkonzentrationen von 10 mg/cm³ erreicht werden (Dutz 2008). Aus *in vivo* Untersuchungen geht hervor, dass diese Konzentration eine zuverlässige Erwärmung des Zielgewebes erlaubt (Hilger et al. 2001). Nach intratumoraler Injektion konnte für die Behandlung von humanen Brusttumoren im Mausmodell eine nahezu komplette Regression gezeigt werden (Dennis et al. 2009). Erste klinische Studien werden momentan zur Behandlung des multiformen Glioblastoms durchgeführt (Jordan und Maier-Hauff 2007,

Latorre und Rinaldi 2009). Ein Nachteil der intratumoralen Injektion ist die ungleiche Verteilung der Nanopartikel im Tumor und die damit verbundene inhomogene Erwärmung des tumortragenden Gewebes (Hilger et al. 2005). Eine vielversprechende Alternative stellt die intravenöse Applikation der Nanopartikel dar. Über eine Kopplung von tumorspezifischen Antikörpern oder Peptiden erreichen die Nanopartikel selektiv den Primärtumor wie auch eventuell vorhandenen Metastasen. Mit den derzeit verfügbaren Absorbern lassen sich nach intravasaler Injektion der Nanopartikelsuspension im Tumor keine für die Hyperthermie ausreichenden Konzentrationen erzielen ($0,4 - 4 \text{ mg/cm}^3$) (Dutz 2008).

Für die biomedizinische Anwendung stehen verschiedene Nanopartikel mit Kernen aus unterschiedlichem Material zur Verfügung (Cherukuri et al. 2010). Aufgrund der niedrigen Toxizität und des körperverschmelzenden Abbaus bei ausreichend langer Zirkulationszeit im Blutkreislauf werden für die diagnostische und therapeutische Anwendung hauptsächlich Nanopartikel mit einem Eisenoxidkern verwendet (Jain et al. 2005, Yu et al. 2008). Um Aggregationen und einen schnellen Abbau durch Makrophagen entgegen zu wirken, tragen die Nanopartikel zusätzlich eine biokompatible Hülle (Peng et al. 2008). Klinische Applikationen von Eisenoxidnanopartikeln tragen klassischerweise eine Hülle aus Dextran oder Carboxydextranderivaten (Shubayev et al. 2009). An die so geschaffenen funktionellen Gruppen können für Tumorzellen spezifische Antikörper, Peptide und kleine Moleküle gekoppelt werden (Peng et al. 2008). Die Bindung an einen für die jeweiligen Tumorzellen spezifischen Rezeptor kann zum einen zur Inhibition des Tumorwachstums und zum anderen für die magnetische Hyperthermie genutzt werden (Wust et al. 2006).

Gemeinsames Ziel der beschriebenen Verfahren zur Wärmebehandlung ist eine gleichmäßige und möglichst hohe Temperatursteigerung im Tumorareal mit Schonung der umliegenden gesunden Bereiche. Aus verschiedenen Untersuchungen geht hervor, dass Tumorzellen vor allem ab Temperaturen um $42,5 \text{ °C}$ gegenüber Hyperthermie sensitiv sind und in den Zustand der Apoptose bzw. Nekrose übergehen (Hildebrandt und Wust 2007a, Bergs et al. 2007). Die klinische Erfahrung hat gezeigt, dass auch in einem niedrigeren Temperaturbereich ab 40 °C indirekte Schädigungen des Tumors durch Beeinflussung der Integrität zellulärer Membransysteme und morphologische Veränderungen beobachtet werden können (van der Zee 2002). Da aufgrund des schnellen Wachstums die Blutversorgung im Tumor häufig ungenügend und ungleichmäßig ist, sodass eine Sauerstoff- und Nährstoffunterversorgung, sowie ein niedriger pH-Wert resultieren (Le Renard et al. 2009), weißt Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe ein erhöhtes Ansprechen gegenüber

Hyperthermie auf (Overgaard et al. 1995). Aus *in vitro* Untersuchungen geht hervor, dass Tumorzellen nach Hyperthermiebehandlung einen zweiphasigen Prozess durchlaufen: Zunächst kommt es in Abhängigkeit zur Behandlungsdauer zu einer linearen Wachstumshemmung, gefolgt von einem exponentiellen Absterben der Zellen, wobei der Übergang in die exponentielle Phase bei höheren Temperaturen früher erreicht wird (Hildebrandt et al. 2002). Eine Behandlung bei mindestens 43°C bewirkt zelluläre Änderungen, die schließlich durch die Induktion von Apoptose und Nekrose direkt zytotoxisch sind. Durch Schwellung und Permeabilisierung des Endothels, Verschiebung der Plasmaflüssigkeit ins Interstitium, Aktivierung der Hämostase und Veränderung der Viskosität der Blutzellmembranen kommt es zu einer verringerten Substratversorgung und einer intratumoralen Azidose, was zum Zelluntergang führt (Hildebrandt et al. 2002). Das Ausmaß des Zelluntergangs hängt dabei nicht nur von der Behandlungsdauer und -temperatur ab, sondern ist auch zwischen den Zelllinien unterschiedlich (Hildebrandt et al. 2002, van der Heijden et al. 2005). Außerdem variiert das Ansprechen auf Hyperthermie zwischen den Zellzyklusphasen. Tumorzellen sind in der M- und S-Phase thermosensibel, während sie sich in der G1-Phase thermoresistent verhalten (Mackey et al. 1992, Hildebrandt et al. 2002). Direkt nach der Wärmeexposition wird die Proteinsynthese gehemmt (Sonna et al. 2002, Katschinski 2004). Nach einer Erholungsphase wird auf ein bestimmtes Proteinmuster umgestellt, die so genannten heat shock proteins (HSPs) (Hildebrandt et al. 2002). Proteine der HSP-Familie sind Chaperone, die fehlgefaltete bzw. entfaltete Proteine in ihrer Konfiguration korrigieren und damit die Zelle vor dem Zelluntergang schützen (Issels 2008). Unter erhöhten Temperaturen denaturieren zelluläre Proteine. Ansammlungen aggregierter Proteine im Zellkern binden an nukleäre Strukturen und Enzyme und hemmen diese in ihrer Funktion. Auf diese Weise werden unter anderem DNA-Reparaturmechanismen (DNA-Polymerase α und β) außer Kraft gesetzt, so dass die Zelle potentiell anfälliger gegenüber äußeren Einflüssen, wie z.B. Strahlung oder Chemotherapie, wird (Hildebrandt und Wust 2007b, Spiro et al. 1982, Jorritsma et al. 1985, Roti Roti 2008). Damit werden durch den Einfluss von Hitze sublethale in lethale Schäden überführt. Diese Beobachtung ebnete den Weg für die Kombination von Hyperthermie mit den klassischen Therapieverfahren Chemo- und/ oder Radiotherapie. Das Ausmaß des Synergismus hängt dabei von der Temperatur, der Behandlungssequenz und in besonderem Maße vom Intervall zwischen beiden Verfahren ab (van der Zee 2002). Der Faktor, um den die Wirkung potenziert wird, variiert je nach Chemotherapeutikum zwischen 1,2 und 23 (van der Zee 2002). Es wird zwischen synergistischen (Cisplatin), additiven (Alkylatien, z.B. Cyclophosphamid, Iphosphamid,

Mitomycin C; Nitroseharbstoffverbindungen; Doxorubicin) und unabhängigen Zusammenhängen (Antimetabolite; Taxane) unterschieden. Einige Substanzen (z.B. Etoposid) verlieren aber auch bei erhöhten Temperaturen aufgrund chemischer Instabilität ihre Wirkung (Hildebrandt et al. 2002, Schlemmer et al. 2004, Kampinga 2006, Bergs et al. 2007). Das Intervall zwischen beiden Behandlungsmodalitäten wird noch kontrovers diskutiert. Viele klinische Anwendungen, wie auch *in vitro* Studien, favorisieren eine simultane Applikation (van der Zee 2002, Issels 2008, Roigas et al. 1998). *In vitro* Untersuchungen zum Einfluss des Zeitfensters zwischen der hyperthermen Behandlung und der chemotherapeutischen Intervention sind nur wenige vorhanden (u.a. Mohamed et al. 2006). Die thermale Chemosensitivierung ist auf ein multimodales Geschehen zurückzuführen, das im Detail noch nicht aufgeklärt ist. Als Ursachen werden ein beschleunigter Transport, eine reduzierte intrazelluläre Detoxifizierung, Interaktionen mit zellulären Zielstrukturen (z.B. Hemmung von Reparaturenzymen, die DNA-Addukte beseitigen), aber auch pharmakokinetische Parameter (Aufnahme, Verteilung und Metabolisierung) diskutiert (Hildebrandt et al. 2002, Schlemmer et al. 2004, Kampinga 2006, Bergs et al. 2007). Um diese additiven Effekte zwischen Wärme und Chemotherapie auszunutzen, aber auch um Chemotherapeutika zielgerichtet zu applizieren und damit Tumorzellen selektiv zu schädigen, werden Chemotherapeutika an Eisenoxidnanopartikel gekoppelt (Chen et al. 2008). Schwerwiegende systemische Nebenwirkungen der chemotherapeutischen Krebstherapie könnten somit verringert und das Ansprechen auf die Therapie verbessert werden. Präklinische Untersuchungen zur Interaktion zwischen Chemotherapeutika und magnetischen Nanopartikeln konnten zeigen, dass durch Kopplung von Chemotherapeutika an magnetische Nanopartikel deren Konzentration im Tumorgewebe im Vergleich zur freien Substanz erhöht wird (Agarwal et al. 2009). Damit ist die Hoffnung verbunden, auch die Wirksamkeit des Zytostatikums zu steigern (Alexiou et al. 2000, Douziech-Eyrolles et al. 2007). Alexiou et al. (2000) untersuchten im Kaninchenmodell die Wirkung von mit dem Zytostatikum Methotrexat gekoppelten Eisenoxidnanopartikeln im statischen Magnetfeld auf das Tumorstadium. Durch die magnetisch induzierte Konzentrationserhöhung des Zytostatikums im Tumor wurde eine Tumorstadiumremission in Konzentrationen beobachtet, die bei alleinigem Einsatz von Methotrexat noch keine Wirkung zeigten (Alexiou et al. 2000). Inwieweit diese Effekte nur auf die Carrierfunktion der Nanopartikel bzw. das statische Magnetfeld zurückzuführen sind, oder ob Mechanismen in Gang gesetzt werden, die die Zelle gegenüber äußeren Einflüssen sensibilisieren, ist noch offen. Ob der transmembranäre Efflux der Zytostatika über Multidrug Resistance Proteine (MDR-Proteine) unter dem Einfluss von Eisenoxidnanopartikeln oder unter hyperthermen

Bedingungen (Chin et al. 1990, Hever-Szabo et al. 1998, Moriyama-Gonda et al. 1998, Vilaboa et al. 2000, Zhang et al. 2003, Wartenberg et al. 2005a, Wei et al. 2007) verändert ist, wird kontrovers diskutiert.

Bei den MDR-Proteinen handelt es sich um ABC-Transporter (Adenosintriphosphat-bindende Cassetten), die in sieben Subfamilien, als ABC A – G bezeichnet, unterteilt werden können (Liu 2009, Hollenstein et al. 2007, Locher 2004, Stavrovskaya und Stromskaya 2008, Kruh et al. 2001, Zhou 2008, Krishna und Mayer 2000, Gottesman et al. 2002). Unter der Hydrolyse von ATP transportieren diese Proteine Endo- und Xenobiotika aus der Zelle heraus und schützen so die Zelle vor potentiell toxischen Substanzen (Borst et al. 2000, Seeger und van Veen 2009). Bis heute sind 49 Vertreter identifiziert, wobei nicht alle für die Drug Resistance verantwortlich zu machen sind (Liu 2009, Borst et al. 2000). Strukturelle Gemeinsamkeit der Transporterfamilie ist ihr Aufbau aus Transmembrandomänen (TMDs) und Nukleotidbindenden Domänen (NBDs) (siehe Abbildung 2). Während P-Glycoprotein (MDR 1, ABC B1) aus zwei Transmembrandomänen (TMD 1 und 2) und zwei mit diesen über intrazelluläre Linkerregionen verbundene Nukleotidbindende Domänen (NBD 1 und 2) verfügt, besitzen einige Transporter der ABC C – Subgruppe (ABC C 1, 2, 3, 6) eine weitere transmembranäre Domäne (TMD 0), die jedoch nicht am Substrattransport beteiligt zu sein scheint (Liu 2009). Eine strukturelle Besonderheit stellt der ABC G2 – Transporter mit nur einer TMD dar (Sarkadi et al. 2006). Die Substratspezifität der Transporter variiert in Größe, Struktur und Funktionalität und reicht von kleinen Molekülen wie Ionen, Kohlenhydraten, Aminosäuren und Antikörpern bis hin zu makromolekularen Verbindungen wie Polysacchariden und Proteinen (Gutmann et al. 2009). Zwischen den einzelnen Transportern überlappen sich sowohl die Spektren an transportierten Substraten als auch die Expression in verschiedenen Tumoren, sodass weder eine direkte Zuordnung eines Chemotherapeutikums noch einer Tumorart zu einem spezifischen Transporter geführt werden kann (Hall et al. 2009). Seit der Entdeckung des MDR 1 – Proteins (ABC B1, P-Glycoprotein) (Juliano und Ling 1976) folgten exzessive Untersuchungen auf diesem Gebiet. Nachdem man anfänglich glaubte, *das* Protein gefunden zu haben, das für zahlreiche klinische Therapieversagen verantwortlich ist, erkannte man durch *in vitro* Untersuchungen, dass nicht alle Resistenzen auf MDR 1 zurückzuführen sind. Im Jahr 1992 wurde ein zweiter Vertreter dieser Proteinfamilie entdeckt: MRP 1 (Cole et al. 1992). Weitere Transporter folgten schnell. MRP 1 ist ein 1531 Aminosäuren umfassendes Protein und gehört zur ABC C – Subfamilie (Liu 2009). Diese Gruppe der sogenannten Multidrug Resistance assoziierten Proteine (MRPs) umfasst bis heute 12, eventuell sogar 13 Mitglieder, zu denen neben 8 Drug Resistance

Transportern auch der CFTR-Kanal (ABC C7) und 2 SUR-Kanäle (ABC C8 und C9) gehören (Locher 2004, Borst et al. 2007, Stavrovskaya und Stromskaya 2008). Im Gegensatz zu P-Glycoprotein, das nur nicht-anionische Substrate transportiert, wird diese Familie für den Transport von anionischen Verbindungen und mit Gluthation, Sulfaten bzw. Glucuronsäure konjugierten Substraten verantwortlich gemacht (Borst et al. 2007).

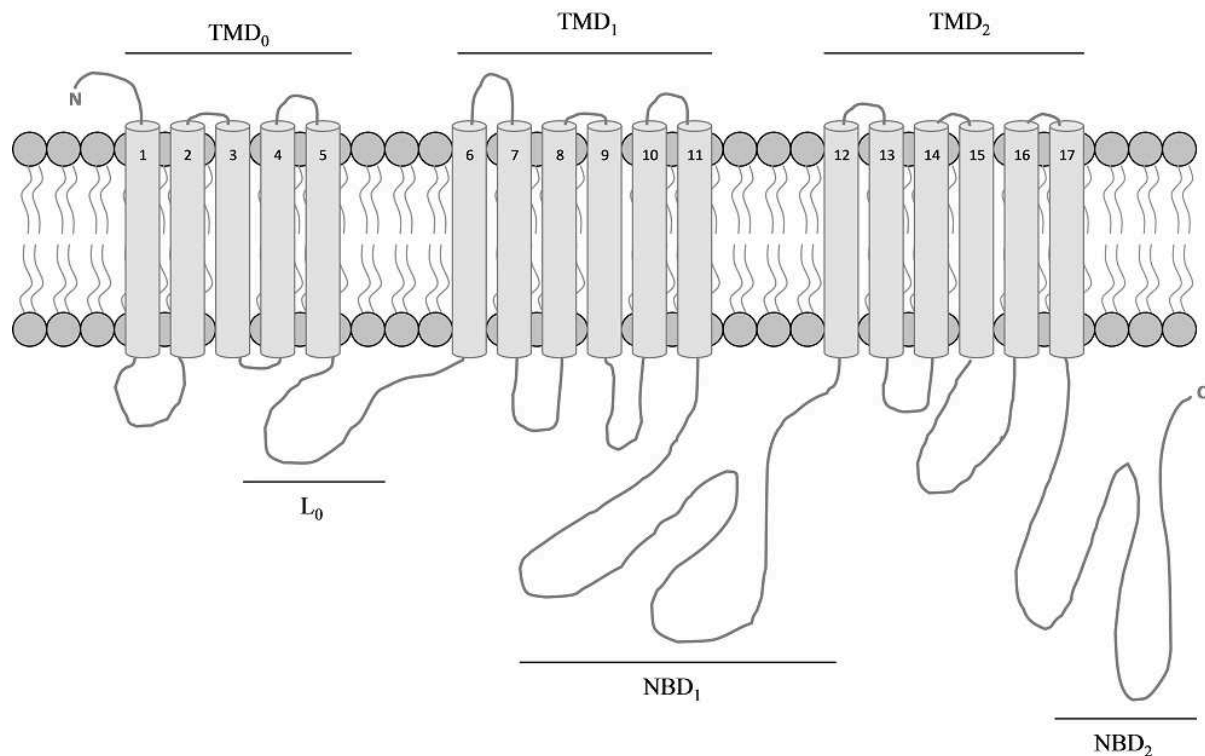


Abbildung 2: Struktureller Aufbau von MRP 1; TMD, Transmembrandomäne; L, Linkerregion; NBD, Nukleotidbindende Domäne (modifiziert nach Bakos und Homolya 2007)

MRP 1 (ABC C1) wurde als hochaffinier Leukotrien C4 – Transporter indentifiziert (Cole et al. 1992). Heute gilt das 190 kDa große Protein als ubiquitär exprimierter Transporter für Endo- und Xenobiotika (Bakos und Homolya 2007). Eine besonders prominente Expression von MRP 1 findet man in proliferierendem Gewebe und in Zellen mit physiologischer Barrierefunktion, indem es im Gegensatz zu anderen MDR-Transportern primär nicht der Entfernung der toxischen Substanz aus dem Organismus, sondern dem Schutz besonders sensibler Zellen vor toxischen Metaboliten durch den Transport in den Blutkreislauf dient (Leslie et al. 2005). Seine Transportfunktion ist dabei an die Anwesenheit von Gluthation gebunden (Bakos und Homolya 2007). Neben seiner Expression in der basolateralen Plasmamembran konnte in verschiedenen Zelllinien und Gewebeproben eine subzelluläre Expression nachgewiesen werden. Die Rolle der Expression von MRP 1 in endozytotischen Vesikeln (Almquist et al. 1995), perinukleären Lysosomen (Rajagopal und Simon 2003) und im trans-Golgi-Apparat (Gennuso et al. 2004, Van Luyn et al. 1998) ist noch unklar. MRP 1

transportiert verschiedene Chemotherapeutika, wie Folsäureantimetabolite, Methotrexat, Pflanzenalkaloide (Vincristin, Vinblastin, SN-38, Etoposid), Anthracycline (Daunorubicin, Doxorubicin), sowie Schwermetallanionen (Arsen) und Antiandrogene (Flutamid). Ob auch Mitomycin C ein Substrat von MRP 1 ist, ist nicht geklärt. Aus der Literatur ist bisher nur bekannt, dass Mitomycin C ein Substrat von P-Glycoprotein ist (Hayes et al. 2001, Stavrovskaya und Stromskaya 2008, Zhou 2008). *In vivo* konnte eine erhöhte Expression von MRP 1 in vielen Tumoren nachgewiesen werden (Bakos und Homolya 2007). Außerdem konnte in klinischen Studien eine negative Korrelation mit dem Gesamtüberleben sowie der rückfallfreien Zeit unter anderem für Brustkrebs, das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom und die Akute myeloische Leukämie gezeigt werden (Bakos und Homolya 2007, Coley 2008), sodass zum aktuellen Stand der Forschung neben MDR 1 und BCRP vor allem MRP 1 eine wichtige Rolle in der klinischen Resistenzentwicklung zugesprochen wird.

Aus *in vitro* Untersuchungen ist zudem bekannt, dass in der resistenten Brustkrebszelllinie MCF-7/AdVp3000 insbesondere ein starker Anstieg von MRP 3 während der Zytostatikabehandlung beobachtet werden kann, weshalb auch eine Beteiligung von MRP 3 an der Entwicklung von multiplen Resistenzen diskutiert wird (Liu et al. 2005). *In vitro* konnten eine Beteiligung in der Resistenzentwicklung gegenüber Etoposid, Teniposid und hohen Konzentrationen von Methothrexat gezeigt werden (Kruh et al. 2001, Borst et al. 2007). Für die Akute lymphatische Leukämie und das Pancreaskarzinom ist die Expression von MRP 3 negativ mit dem Tumorgrad und dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert (Konig et al. 2005, Borst et al. 2007). Die physiologische Funktion von MRP 3 ist noch weitestgehend unbekannt. Unter cholestatischen Bedingungen konnte eine Hochregulation von MRP 3 gezeigt werden. Daher wird davon ausgegangen, dass MRP 3, wenn der kanalikuläre Weg der Exkretion von Gallesekreten blockiert ist, eine Entgiftungsrolle einnimmt. Indem das in der basolateralen Membran exprimierte MRP 3 die toxischen Substrate in den Blutkreislauf zurücktransportiert, wird die Leber vor Schäden durch die angestauten Substrate geschützt (Kruh et al. 2007).

Trotz mehr als 30 Jahren Forschung auf dem Gebiet der MDR-Proteine gibt es bis heute keine effektive Möglichkeit, die transportermedierte Multidrug Resistance zu überwinden (Krishna und Mayer 2000). Eine Reihe von Inhibitoren, angefangen von Verapamil und Cyclosporin A bis hin zu neueren halbsynthetischen Substratanaloga, wurden entwickelt, um die Aktivität der ABC-Transporter in Tumorzellen zu reduzieren. Dabei standen dem klinischen Erfolg vor allem zwei Mechanismen entgegen: Aufgrund zu hoher Nebenwirkungen der Inhibitoren

selbst können keine suffizienten Konzentrationen erzielt werden und zum anderen muss bedacht werden, dass auch die physiologische Detoxifikationsfunktion blockiert wird und damit für besonders sensitive Gewebe nicht absehbare Konsequenzen entstehen. Da mit den derzeit eingesetzten Inhibitoren noch kein Erfolg versprechender klinischer Einsatz möglich ist, wird nach neuen Wegen gesucht, die Multidrug Resistance zu überwinden. In jüngster Zeit konnte durch *in vitro* Studien gezeigt werden, dass Chemotherapeutika zu einer Steigerung der Expression von MDR-Proteinen führen. Einige alkylierende Substanzen, zu denen Mitomycin C gehört, scheinen hingegen in der Lage zu sein, eine Expressionserniedrigung zu bewirken (Maitra et al. 2001b, Ihnat et al. 1997).

In der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie wird an der Entwicklung einer multivalenten magnetischen Wärmebehandlung zur minimal-invasiven Behandlung von Brustkrebs gearbeitet. Grundlage dieser Therapieoption ist die kombinierte Applikation von Chemotherapeutika und superparamagnetischen Nanopartikeln, die zu einer selektiven Erwärmung des tumortragenden Gewebes und damit zur selektiven Zerstörung des Tumors führen. Ferner sollen die additiven Effekte zwischen Hyperthermie und bestimmten Chemotherapeutika ausgenutzt werden. Im Rahmen der Entwicklung neuer Therapieoptionen im Kampf gegen maligne Erkrankungen spielt das Abschätzen von Mechanismen, die für ein Versagen der Therapie verantwortlich sein können, eine entscheidende Rolle. Da die Entwicklung von multiplen Resistenzen für über 90 % des Therapieversagens der konventionellen Chemotherapie im Rahmen der Behandlung von Brustkrebs verantwortlich gemacht wird (Coley 2008), erscheint die Frage von großer Bedeutung, ob diese Transporter auch unter dem Einsatz magnetischer Hyperthermie in Kombination mit Chemotherapie beeinflusst werden. Bisher ist nicht bekannt, wie sich MDR-Proteine unter dem kombinierten Einsatz von Hyperthermie, Chemotherapie und magnetischen Nanopartikeln verhalten. Offen ist die Frage, ob durch diese minimal-invasive Therapieoption Mechanismen in Gang gesetzt werden, die dem Ansprechen der Chemotherapie entgegenwirken oder ob damit die Hoffnung verknüpft werden kann, eine Möglichkeit zu finden, die Multi Drug Resistance und damit das Versagen zahlreicher Therapien zu überwinden.

3 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von Hyperthermie, Chemotherapie, magnetischen Nanopartikeln, sowie deren Kombination auf die Expression eines ubiquitär und eines vor allem in resistenten Brustkrebszellen exprimierten MDR-Proteins zu untersuchen. Daher wurden die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen *in vitro* Untersuchungen in Bezug auf die Expression des ubiquitär exprimierten MRP 1 und des in resistenten Brustkrebszellen stark hochregulierten MRP 3 durchgeführt.

Im ersten Teil der Arbeit sollte ein System zum Nachweis von MRP 1 und MRP 3 auf RNA- und Proteinebene in einer humanen Adenokarzinomzelllinie etabliert werden. Dazu sollte die für MRP 1 als positiv beschriebenen MCF-7-Zellen verwendet werden.

Der zweite Teil der Arbeit sollte einen Beitrag zum Verständnis der Beeinflussung der Expression von MRP 1 und MRP 3 durch Hyperthermie, sowie Chemotherapie und magnetische Nanopartikel in Kombination mit Hyperthermie leisten. Dazu sollte die in der Arbeitsgruppe für *in vitro* Untersuchungen im Rahmen der magnetischen Wärmebehandlung verwendete humane Adenokarzinomzelllinie BT-474 genutzt werden. Da vor allem Alkylantien ein hohes synergistisches Potenzial mit Hyperthermie zugesprochen wird und im Weiteren eine Kopplung an die Eisenoxidnanopartikel erfolgen soll, wurde Mitomycin C für die Versuche verwendet. Ferner sollte die Kombination der drei genannten Modalitäten in Bezug auf ihr Potential, die Expression von MRP 1 und 3 zu ändern, untersucht werden. Dazu sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Welchen Einfluss hat eine hypertherme Behandlung bei 43°C auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 in BT-474-Zellen? Um den Zeitpunkt einer möglichen Expressionsänderung näher einzugrenzen, sollte die Hyperthermie in Anlehnung an den klinischen Einsatz erhöhter Temperaturen zur Behandlung maligner Erkrankungen über einen Zeitraum von 15 bis 120 Minuten durchgeführt werden und variable Postinkubationszeiten von 0 bis 48 Stunden untersucht werden.
- Hat die Behandlung mit Mitomycin C (am Beispiel einer Konzentration von 0,15 und 1,5 µg/cm²) einen Einfluss auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 in BT-474-Zellen? Wenn ja, ist eine Änderung von der Mitomycin C – Konzentration und/ oder der Postinkubationszeit abhängig? Verändert die zusätzliche Einwirkung von

Hyperthermie bei 43°C den Einfluss von Mitomycin C auf die Expression von MRP 1 und MRP 3? Wenn ja, welche Hyperthermiedauer ist dazu erforderlich? Dies sollte am Beispiel einer Hyperthermiedauer von 60 und 90 Minuten untersucht werden.

- Haben dextranumhüllte, magnetische Eisenoxidnanopartikel (am Beispiel einer Konzentration von 1,5, 15 und 150 µg Fe/ cm²) einen Einfluss auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 in BT-474-Zellen? Wenn ja, ist der Effekt konzentrationsabhängig? Hat eine zusätzliche Behandlung mit Hyperthermie bei 43°C (am Beispiel von 60 und 90 Minuten Hyperthermie) einen Einfluss?
- Wie verändert sich die Expression von MRP 1 und MRP 3 in BT-474-Zellen, wenn magnetische Eisenoxidnanopartikel, Hyperthermie bei 43 °C und Mitomycin C in Kombination auf diese einwirken? Dabei sollte durch den Einsatz verschiedener Nanopartikelkonzentrationen (am Beispiel einer Konzentration von 1,5, 15 und 150 µg Fe/ cm²) überprüft werden, ob es einen Zusammenhang mit der verwendeten Partikelkonzentration gibt. Für die Untersuchung sollten die effektstärkste Hyperthermiedauer und Mitomycin C – Konzentration eingesetzt werden.

Um den Einfluss der beschriebenen Einzelmodalitäten, sowie deren Kombination auf die Lebensfähigkeit von Adenokarzinomzellen in Kultur zu untersuchen, sollten im dritten Teil der Arbeit Vitalitätsuntersuchungen an BT-474-Zellen nach Behandlung mit Mitomycin C, magnetischen Eisenoxidnanopartikeln und deren Kombination in An- und Abwesenheit von Hyperthermie gemacht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Geräte und sonstige Materialien

In Tabelle 1 sind die für die Versuche verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte mit Angabe von Hersteller und Firmensitz

Gerät	Hersteller
Agarose-Elektrophoresekammer und Zubehör	BioRad Laboratories GmbH; München
Brenner	<i>schuett phoenix</i> , Göttingen Heraeus; Hanau <i>Heraeus vulcan</i> , Göttingen Heraeus; Hanau
Brutschrank	<i>Heracell</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Doppelgel-Elektrophoresesystem und Zubehör	<i>PerfectBlue™ Twin S (45-1010i)</i> , Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen mit Stromversorgungsgerät <i>PowerPac™ Basic Power Supply</i> , BioRad Laboratories GmbH; München
Durchflusszytometer	<i>FC500</i> , Beckman Coulter; Krefeld
Feinwaage	<i>Isocal AC 211P</i> , Sarorius AG; Göttingen
Gefrierschrank (-80°C)	<i>-86°C ULT Freezer Thermor forma</i> , Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Homogenisator	<i>Sonoplus UW 2200</i> , Bandelin; Berlin
Kipp-/ Rollenmischer	<i>Stuart SRT6D</i> , Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Lumineszenz Viewer	<i>LAS 3000 Intelligent Dark Box</i> , Fujifilm, Elektronik Imaging Europe GmbH; Düsseldorf
Magnetrührer	<i>IKA® RH digital KT/C</i> , IKA-Werke GmbH & Co. KG; Staufen
Mikroplatten-Reader	<i>Tecan Sunrise Basic</i> , Tecan Deutschland GmbH; Crailsheim
NanoDrop	<i>ND 1000</i> , Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Phasenkontrastmikroskop	<i>CK 40</i> , Olympus Deutschland GmbH; Hamburg
pH-Meter	<i>MP220</i> , Mettler-Toledo GmbH; Gießen
Pipetten	<i>Reference</i> , Eppendorf AG; Hamburg <i>Nichipet EX</i> , Nichiryo/ Novodirekt GmbH; Kehl/

	Rhein <i>Transferpette S</i> , Brand GmbH und Co. KG; Wertheim <i>Transferpette S -8/ -12</i> , Brand GmbH und Co. KG; Wertheim
Pipettierhilfe	<i>Accu-Jet</i> [®] , Brand GmbH und Co. KG; Wertheim
Präzisionswaage	<i>Kern 440-47N</i> , Kern & Sohn GmbH; Balingen- Frommern
Saugpumpe	<i>MedAP</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Schüttelapparat	<i>Heidolph Titramax 100</i> , Heidolph Instruments GmbH & Co.KG; Schwabach)
Schüttelinkubator	<i>GFL-3031</i> , Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel
Semi-Dry Elektorblotter	<i>PerfectBlue</i> TM , Modell <i>SEDEC M</i> , PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen mit Stromversorgungsgerät <i>Consort E844</i> , Sigma Aldrich Chemie GmbH; München
Sicherheitswerkbank	<i>Hera safe</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte <i>Holten LaminAir</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Spektrophotometer	<i>Ultrospec 3300 pro</i> , GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
Stromversorgungsgerät das gehört zur Elektrophoreseapparatur	<i>Consort E844</i> , Sigma Aldrich Chemie GmbH; München <i>PowerPac</i> TM <i>Basic Power Supply</i> , BioRad Laboratories GmbH; München
Taumelmischer	<i>Heidolph Polymax 2040</i> , Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach
Thermocycler	<i>Primus 25 advanced</i> , PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen)
Thermomixer	<i>Eppendorf Thermomixer Comfort</i> , Eppendorf AG; Hamburg
Ultraschallreinigungsgerät	<i>Sonorex Super RK52H</i> , Bandelin; Berlin
UV-Imager	<i>Image Master</i> [®] <i>VDS</i> , Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg
Vakuumkonzentrator	<i>Speed Vac SPD111V</i> , Fisher Scientific GmbH;

	Schwerte
Vakuumpumpe	<i>Vacusafer</i> , Integra Biosciences; Fernwald <i>Gel Pump GP110</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Vortexer	<i>Vortex Genie 2 G560E</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Wasserbad	<i>Lauda E100</i> , Dr. R Worbser GmbH + Co. KG; Lauda-Königshofen
Zellzähler	<i>CASY Zellzähler Model TT</i> , Innovatis AG; Reutlingen
Zentrifuge	<i>Biofuge primo</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte <i>Centrifuge 5417R</i> , Eppendorf AG; Hamburg <i>Centrifuge 5425</i> , Eppendorf AG; Hamburg <i>Uni-Fuge</i> , Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe <i>Ultrazentrifuge Optima XL-100K</i> mit Rotor <i>Sw60Ti</i> , Beckman Coulter; Krefeld

In Tabelle 2 sind die für die Versuche genutzten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Materialien mit Angabe von Hersteller und Firmensitz

Material	Hersteller
96-Well-Platten	<i>96 Well Polystyrol Microplatte, transparent, #655180</i> , Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Ultrafiltrationsröhrchen	<i>Amicon Centrifugal Filter Units</i> , Millipore GmbH; Schwalbach/ Ts
Bechergläser	VWR International GmbH; Darmstadt
Einfrierbox für Kryovials	<i>Kryo-Freezing-Container</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Eppendorf Safe Lock Tubes	<i>Safe-lock Reaktionsgefäße</i> , Eppendorf AG; Hamburg
FACS-Röhrchen (5 ml)	<i>Polystyrene Round-Bottom Tube</i> , BD Bioscience; Heidelberg
Falcontubes (15 und 50 ml)	<i>Cell star</i> , Greiner Bio-One GmbH; Solingen
Faltenfilter	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Gel-Blotting-Papier	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Gelfärbeschalen	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Glasflaschen	Schott AG; Mainz

Glaspipetten (5, 10 und 20 ml)	<i>Messpipetten</i> , Hirschmann Laborgeräte GmbH + Co. KG; Eberstadt
Kanülen	Braun Melsungen AG; Melsungen
Kryovials	<i>Cryogenic Vials</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Küvetten (Polysterol)	<i>Halb-Micro-Küvetten</i> , 10 x 4 mm, Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Messbecher	<i>Fisherbrand</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Messzylinder	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG; Eberstadt
Pasteurpipetten	<i>Assistant-Präzision</i> , Karl Hecht KG; Sondheim
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH; Solingen) Brand GmbH und Co. KG; Wertheim)
Pipettenspitzen mit Filter	<i>Multi Guard Barrier Tips</i> , Sorenson BioScience Inc.; Bezug über Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe <i>Non-self-sealing Filterspitzen</i> , Brand GmbH und Co. KG; Wertheim
PVDF-Membran	Roche diagnostics GmbH; Mannheim
Reagenzreservoir	Brand GmbH und Co. KG; Wertheim
Spritze (10 ml)	Braun Melsungen AG; Melsungen
Sterilfilter 0,2 µm	<i>Syringe Filter</i> , Fisher Scientific GmbH; Schwerte
Trichter	VWR International GmbH; Darmstadt
Verschlussfolie	<i>Parafilm</i> , Brand GmbH und Co. KG; Wertheim
Zellkulturflaschen	<i>Cell star</i> (75 und 175 cm ²), Greiner Bio-One GmbH; Solingen
Zellschaber (28 cm)	Greiner Bio-One GmbH; Solingen
Zentrifugenröhrchen	11 x 60 mm, Beckman Coulter; Krefeld

4.2 Chemikalien, Antikörper, Primer und kommerziell erworbene Kits

In Tabelle 3 sind die für die Versuche verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien mit Angabe von Hersteller und Firmensitz

Substanz	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	<i>HEPES</i> , Invitrogen GmbH; Karlsruhe

Acrylamid/Bisacrylamid	<i>Rotiphorese NR-Acrylamid/Bis 30% (29:1)</i> , Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Agarose	<i>Agarose NEE0</i> , Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Albumin Fraktion V	<i>BSA</i> , Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	<i>APS</i> , Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH; Heidelberg
Calciumchlorid	<i>CaCl₂</i> , Sigma-Aldrich GmbH; München
CASY [®] ton	Innovatis AG; Reutlingen
Chemiluminescent HRP Substrate	<i>Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate</i> , Millipore GmbH; Schwalbach/ Ts
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Coomassie Brilliantblau G-250	Merck KGaA; Darmstadt
Diethylpyrocarbonat-Wasser	<i>DEPC-Wasser</i> , Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	<i>DMSO</i> , Merck KGaA; Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	<i>Na₂HPO₄</i> , Sigma-Aldrich GmbH; München
Dithiothreitol	<i>DTT</i> , Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Eisenoxidnanopartikel das ist keine Chemikalie	fluidMAG-DX, Lot. 1707/08 und 1103/10, chemicell GmbH; Berlin
Ethanol	<i>Ethanol absolut (99%)</i> , Merck KGaA; Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat	<i>EDTA</i> , Sigma-Aldrich GmbH; München
Formaldehyd-Lösung 37%	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Kaliumchlorid	<i>KCl</i> , Sigma-Aldrich GmbH; München
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>KH₂PO₄</i> , Sigma-Aldrich GmbH; München
Magnesiumchlorid	<i>MgCl₂</i> , Sigma-Aldrich GmbH; München
Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe, Deutschland
Mitomycin C	<i>C₁₅H₁₈N₄O₅</i> , Applichem GmbH; Darmstadt
MTS	<i>CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay</i> , Promega, Mannheim

N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin	TEMED, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Natrium-EDTA	Sigma-Aldrich GmbH; München
Natriumhydroxid	NaOH, Sigma-Aldrich GmbH; München NaOH, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Natriumpyruvat	Biochrom AG; Berlin
Percoll	GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg
Phenylmethylsulfonylfluorid	PMSF, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Phosphorsäure (85%)	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
RNase-Inhibitor	Quiagen GmbH; Hilden
Roti®-Block, 10fach	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Salzsäure 37%ig	HCl, Sigma-Aldrich GmbH; München
Sodiumdodecylsulfat	SDS, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Succinylsäure	Sigma-Aldrich GmbH; München
Sucrose	Sigma-Aldrich GmbH; München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris-Base, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Tris-HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH; München
Trizol®-Reagent	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
Trockenmilchpulver	Humana Milchunion eG; Everswinkel
Trypsin (0,05%)/ EDTA	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
Tween20	BioRad Laboratories GmbH; München
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe

Antikörper

In Tabelle 4 sind die für die Versuche eingesetzten Antikörper, deren Ursprungs- und Zielspezies, sowie eventuell vorhandene Konjugationen aufgeführt.

Tabelle 4: Zum Nachweis von MRP 1, MRP 3 und GAPDH verwendete Antikörper

Zielstruktur	Hersteller	Zielspezies	Ursprungsspezies	Konjugation
GAPDH	sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg	Human	Hase	-

IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; bezogen über dianova GmbH; Hamburg	Maus	Ziege	HRP
IgG	Jackson ImmunoResearch/ Abcam; Cambridge, UK	Hase	Ziege	HRP
IgG	Acris Antibodies GmbH; Hiddenhausen	Maus	Ziege	FITC
MRP 1	<i>MRPm5</i> , Abcam; Cambridge, UK	Human	Maus	-
MRP 1	<i>clone QCRL-1</i> , Sigma-Aldrich GmbH; München	Human	Maus	-
MRP 3	<i>M3II-21</i> , Abcam; Cambridge, UK	Human	Maus	-

Primer

In Tabelle 5 sind die für die Versuche verwendeten Primer aufgeführt. Alle Primer wurden über Jena Bioscience (Jena) bezogen. Zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde ein 5fach Mastermix (*Red Load Taq Master Mix*, Jena Bioscience; Jena) verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Primer, dargesellt mit Sequenz, Annealingtemperatur und Produktlänge

Primer	Sequenz (5'-3')	Annealingtemperatur [°C]	Produktlänge [bp]
GAPDH	<i>Foreward</i> TCGGAGTCAACGGATTTGGTCGTA	65	
	<i>Reverse</i> ATGGACTGTGGTCATGAGTCCTTC	65	521
MRP 1	<i>Foreward</i> CTGTCTGGGCATCCAGGAT	63	
	<i>Reverse</i> CTGTCTGGGCATCCAGGAT	59	286
MRP 3	<i>Foreward</i> ACACGTTTGTGAGCTCCCAG	60	
	<i>Reverse</i> GCAATGAGGTTGGCTGGAGAAT	62	322

Gößenmarker

Als Größenmarker wurde in der Agarosegelelektrophorese eine DNA-Leiter (*100 bp, linear scale DNA-Ladder*, JenaBioscience GmbH; Jena) mitgeführt.

Als Größenstandart zum Nachweis von GAPDH, MRP 1 und MRP 3 auf Proteinebene dienten eine 40 – 300 kDa Proteinleiter (*PageRuler Multicolor High Range Protein Ladder*, Fermentas GmbH; Leon-Rot), sowie ein gereinigtes MRP 1 (*Human MRP1-membranes*, BD Biosciences; Heidelberg) und ein gereinigtes MRP 3 (*Human MRP3-membranes*, BD Biosciences; Heidelberg).

Kommerziell erworbene Kits

In Tabelle 6 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten kommerziell erworbenen Testsysteme aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete kommerziell erworbene Kits

Kit	Hersteller
cDNA-Synthese-Kit	<i>cDNA-Synthesis-Kit</i> , Bioline GmbH; Luckenwalde <i>Omniscript RT Kit</i> , Qiagen GmbH; Hilden
Oligo-dT-Primer	JenaBioscience GmbH; Jena
Membranprotein-Isolations-Kit	<i>Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit</i> , Fisher Scientific GmbH, Schwerte <i>ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit</i> , Fermentas GmbH; Leon-Rot
QuantiPro™ BCA Assay	<i>QuantiPro BCA Assay Kit</i> , Sigma-Aldrich GmbH; München
RNA-Isolations-Kit	<i>High Pure RNA-Isolation Kit</i> , Roche diagnostics GmbH; Mannheim

4.3 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer und Lösungen

Blockpuffer I

5% (v/v) Magermilchpulver in Waschpuffer

Blockpuffer II

1fach Roti®-Block in Waschpuffer

Blockpuffer III

5% (v/v) BSA in Waschpuffer

Bradford-Reagenz

50 mg Coomassie Brilliantblau G-250

25 ml 96 %igen Ethanol

425ml Aqua dest.

→ langsam 50 ml 85 %ige Phosphorsäure zufügen

→ in Alufolie verpackt 15 min auf Magnetrührer mischen

→ in lichtundurchlässige 500 ml-Flasche filtrieren

Elektrophoresepuffer

0,2 M Glycin

0,025 M Tris-HCl

pH 8,8

0,5 % (w/v) SDS

FACS-Puffer

1 % (w/v) BSA

0,2 % Tween20

in 1x PBS, pH 7,4

Gradientenpuffer

0,25 M Sucrose

10 mM HEPES

100 mM Succinylsäure

1 mM EDTA

2 mM CaCl_2

2 mM MgCl_2

pH 7,4

Hochsalzwaschpuffer

0,2 % (w/v) SDS

0,5 M NaCl

Hypotoner Puffer

10 mM Tris
1,5 mM MgCl₂
10 mM NaCl pH 6,8

Lysepuffer

1 % (v/v) Triton X-100
20 mM Tris-HCl pH 6,8
150 mM NaCl
1 mM EDTA

Percoll-Sucrose-Gradientenlösung

1,9 ml Percoll
10 % (v/v) PBS, pH 7,4
0,19 ml 2,5M Sucrose-Lösung

Phosphat buffered saline (PBS)

2,7 mM KCl
137 mM NaCl
1,47 mM g KH₂PO₄
8 mM Na₂HPO₄ pH 7,4

Proteaseinhibitorcocktail-Stammlösung

1 Tablette Complete in 1,5ml Aqua dest. lösen, 1:7 einsetzen

Radioimmunpräzipitationspuffer-Ansatz (RIPA)

50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat pH 8,0
1 % (v/v) Triton-X100
0,1 % (w/v) SDS

Sammelgelpuffer

Ansatz 2 x: 0,25 M Tris pH 6,8

SDS-Probenpuffer

Ansatz 2 x:

0,12 M Tris-HCl	pH 6,8
20 % (w/v) Glycerin	
0,02 % (w/v) Bromphenolblau	
10 % (v/v) β-Mercaptoethanol	
4 % (w/v) SDS	
0,2 M Dithiothreitol	

Stripping-Puffer

100 mM NaOH
2 % (w/v) SDS
0,5 % DTT

Transferpuffer

0,025 M Tris-Base
0,192 M Glycin
20 % (v/v) Methanol
pH 8,3

Trenngelpuffer

Ansatz 4 x: 1,5 M Tris pH 8,8

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)

40 mM Tris-Base
20 mM Eisessig
0,2 mM EDTA

pH8,0

Verdünnungspuffer I

1% (v/v) Magermilchpulver in Waschpuffer

Verdünnungspuffer II

0,1fach Roti®-Block in Waschpuffer

Verdünnungspuffer III

1% (v/v) BSA in Waschpuffer

Waschpuffer

0,1% (v/v) Tween20 in PBS, pH 7,4

In Tabelle 7 sind die für die Zellkultur verwendeten Medien aufgeführt.

Tabelle 7: Für die Zellkultur verwendete Medien

Substanz	Hersteller
Foetales Kälberserum	<i>FKS, Gibco, Invitrogen GmbH; Karlsruhe</i>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/ Häm's F-12	<i>Gibco, Invitrogen GmbH; Karlsruhe</i>
Hank's Balanced Salt Solution	<i>HBSS, PAA Laboratories GmbH; Cölbe</i>
Penicillin/ Streptomycin	<i>Biochrom AG; Berlin</i>

4.4 Zellkultur

Die Durchführung aller Arbeiten erfolgte steril unter der Sicherheitswerkbank (*Hera safe*, Fisher Scientific GmbH; Schwerte). Um die Wachstumsbedingungen konstant zu halten, wurden die verwendeten Substanzen vor Arbeitsbeginn auf 37°C äquilibriert. Vor und nach jedem Arbeiten erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellen, um Morphologie und Dichte des Zellrasens zu beurteilen. Die für die MCF-7- und BT-474-Zellen verwendete Nährlösung, die sich zu gleichen Teilen aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und Häm's F-12 (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) mit 10 % Foetalen Kälberserum (FKS) (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) zusammensetzte, wird im Folgenden als Zellkulturmedium bezeichnet.

4.4.1 Verwendete Zelllinien

4.4.1.1 MCF-7-Zellen

Die MCF-7-Zelllinie (CLS - Cell Lines Service; Eppelheim) ist eine humane Brustkarzinom-Zelllinie. Sie wurde aus einem Pleuraerguss einer 69jährigen Patientin mit Adenokarzinom der Brustdrüse isoliert und wächst als Monolayer.

MCF-7-Zellen sind für die Multidrug Resistance Proteine MRP 1 und MRP 3 als positiv beschrieben (Liu et al. 2005, Faneyte et al. 2004). Daher wurden MCF-7-Zellen zur

Etablierung der MRP 1- und MRP 3-Membranproteinisolation, -Proteinbestimmung, -SDS-PAGE, -Immunodetektion, -RNA-Isolation und -cDNA-Synthese verwendet.

4.4.1.2 BT-474-Zellen

Bei den BT-474-Zellen (CLS - Cell Lines Service; Eppelheim) handelt es sich um eine humane Brustkarzinom-Zelllinie. Diese Zelllinie wurde aus einem soliden, invasiven, duktalem Tumor der Brust isoliert. Die BT-474-Zellen bilden kompakte, mehrschichtige Kolonien, die langsam wachsen. Es gibt bisher keine Aussage in der Literatur, ob BT-474-Zellen MRP 1 und MRP 3 exprimieren.

4.4.2 Auftauen kryokonservierter Zellen

Die in flüssigem Stickstoff bei -196 °C eingefrorenen MCF-7- bzw. BT-474-Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad (*Lauda E100*, Dr. R Worbser GmbH und Co. KG; Lauda-Königshofen) aufgetaut, in ein Falconröhrchen (*Cell star*, Greiner Bio-One GmbH; Solingen) überführt und auf 10 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Um das cytotoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck KGaA; Darmstadt), das dem Einfriermedium zum Schutz vor Zellschäden durch die Bildung von Eiskristallen zugesetzt wurde, zu entfernen, wurde die Zellsuspension 5 min zentrifugiert (200 g, 22 °C). Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine, entsprechend Tabelle 8 mit Zellkulturmedium vorbereitete Zellkulturflasche (*Cell star*, Greiner Bio-One GmbH; Solingen) überführt.

Tabelle 8: Kultivierung von humanen Adenokarzinomzellen. Dargestellt sind Aussaatdichte, die zum Ablösen benötigte Trypsinmenge und die Menge an spezifischem Zellkulturmedium in Abhängigkeit der Wachstumsoberfläche.

Oberfläche [cm ²]	Zellzahl bei Aussaat	zum Ablösen benötigte Trypsinmenge [ml]	Menge an Wachstumsmedium pro Flasche [ml]
75	1-2 x 10 ⁶	1,5	15
175	2-4 x 10 ⁶	3	30

4.4.3 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der MCF-7- bzw. BT-474-Zellen erfolgte bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (*Heracell*, Fisher Scientific GmbH; Schwerte). Zur Vermehrung, sowie für die durchgeführten Versuche, wurden die Zellen in Zellkulturflaschen

gezogen und nach 2 – 3 Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das alte Zellkulturmedium mittels Pasteurpipette, die über ein Schlauchsystem mit einer Vakuumpumpe (*Vacusafe*, Integra Biosciences; Fernwald) verbunden war, aus der Zellkulturflasche entfernt und entsprechend Tabelle 8 frisches Zellkulturmedium zugefügt. Bei Erreichen von 80 – 90 %iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert (1 – 2mal pro Woche). Da Mycoplasmen lichtmikroskopisch nicht sensitiv genug erkennbar sind, wurden nach dem Auftauen einer neuen Passage kryokonservierter MCF-7- bzw. BT-474-Zellen diese mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf Mycoplasmenfreiheit getestet. Für die Durchführung wird der MTRA Yvonne Heyne gedankt.

4.4.4 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen von 80 – 90 %iger Konfluenz wurden die MCF-7- bzw. BT-474-Zellen passagiert. Dazu wurde das verbrauchte Zellkulturmedium abgesaugt und der Zellrasen 3mal mit je 10 ml Hank's BSS (PAA Laboratories GmbH; Cölbe) gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, wurde auf den Zellrasen entsprechend Tabelle 8 Trypsin (0,05%)/EDTA (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) gegeben und die Zellkulturflasche für 3 – 5 min im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Da sich die MCF-7-Zellen sehr stark adhärent verhalten hatten, wurde bei diesen zusätzlich ein Zellschaber (Greiner Bio-One GmbH; Solingen) zum Ablösen des Zellrasens verwendet. Nachdem sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde auf 10 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt und die Zellsuspension durch Aufsaugen in eine Glaspipette homogenisiert, bevor die Suspension in ein Falconröhrchen überführt wurde. 25 µl der Zellsuspension wurden sofort abgenommen und für die Zellzählung mittels CASY[®]-Zellzähler (*Modell TT*, Innovatis AG, Reutlingen), wie in Abschnitt 4.4.5 beschrieben, weiter verwendet. Anschließend wurde die Zellsuspension um das Trypsin zu entfernen, zentrifugiert (5 min, 200 g, 22°C) und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die in Tabelle 8 aufgeführte Zellzahl wurde in die entsprechende Zellkulturflasche überführt.

Für molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen wurde das Zellpellet nach Entfernung des trypsinhaltigen Zellkulturmediums in 10 ml 1x Hank's BSS resuspendiert und das der in Tabelle 9 aufgeführten Zellzahl entsprechende Volumen in Eppendorf-Cups (*Safe-lock Reaktionsgefäße*, Eppendorf AG; Hamburg) überführt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 200 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 9: Menge humaner Adenokarzinomzellen zur Durchführung der molekularbiologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen, ermittelt nach Ablösen der Zellen vom Flaschenboden

	Methode	Eingesetzte Zellzahl
RNA-Isolation	Trizol [®] -Reagent	5 x 10 ⁶
	High Pure RNA-Isolation Kit	1 x 10 ⁶
Protein-Isolation	Gesamtproteinextraktion mittels RIPA-Lysepuffer	1 x 10 ⁶
	Membranproteinisolation mittels ProteoJET [™]	5 x 10 ⁶
	Membrane Protein Extraction Kit	
	Membranproteinisolation mittels Mem-PER [®]	5 x 10 ⁶
	Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit	
	Membranproteinextraktion mittels Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation	1 x 10 ⁷
	Detergentienbasierte Membranproteinextraktion	7 x 10 ⁶
Durchflusszytometrie		1 x 10 ⁶

4.4.5 Zellzahlbestimmung mittels CASY-Zellzähler

Das Messprinzip des CASY-Zellzählers beruht auf einer elektrischen Impulsanalyse. Dabei wird die Zellsuspension in eine Kapillare gesaugt, an die während der Messung eine Spannung angelegt wird. Aufgrund der durch die Zellen verdrängten Menge an Elektrolytlösung und den dadurch entlang der Kapillarstrecke entstehenden elektrischen Widerstand, kann über den Zellzähler in Debris, tote Zellen und lebende Zellen unterschieden werden. Für jede Zelllinie musste im Vorfeld kalibriert werden.

Während des Passagierens von MCF-7- bzw. BT-474-Zellen wurden, wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben, 25 µl der Zellsuspension in 10 ml Casy[®]Ton (Innovatis AG; Reutlingen) gegeben und kurz invertiert. Die Zahl vitaler Zellen pro ml Zellsuspension wurde bestimmt und das Volumen mit der der Wachstumsfläche entsprechenden Zellzahl (siehe Formel 1) ermittelt.

$$\frac{\text{Lebendzellzahl pro ml}}{10 \text{ ml}} = \frac{\text{einzusetzende Zellzahl}}{\text{abzunehmendes Volumen in ml}}$$

$$\text{abzunehmendes Volumen in ml} = \frac{\text{einzusetzende Zellzahl}}{\text{Lebendzellzahl pro ml}} \times 10 \text{ ml}$$

Formel 1: Ermittlung des für die Aussaat von Zellen einzusetzenden Volumens an Zellsuspension

4.4.6 Kryokonservierung von Zellen

Das für die Kryokonservierung von MCF-7- bzw. BT-474-Zellen benutzte Einfriermedium, das sich aus Zellkulturmedium mit 8% Dimethylsulfoxid (DMSO) zusammensetzte, wurde vor Arbeitsbeginn auf 4°C abgekühlt. Durch den Zusatz von DMSO wurde verhindert, dass die Zellen durch intrazellulär beim schnellen Abkühlen entstehende Eiskristalle beschädigt werden. Das Zellpellet (siehe Abschnitt 4.4.4) wurde in Einfriermedium resuspendiert und 1×10^7 Zellen/ml in jedes Kryoröhrchen (*Cryogenic Vials*, Fisher Scientific GmbH; Schwerte) eingesetzt. Um cytotoxische Wirkungen des DMSO zu verhindern, wurden die Kryoröhrchen schnellstmöglich eingefroren. Dazu wurden die Kryoröhrchen in mit Isopropanol befüllten und vorgekühlten Einfrierbehältnis (*Kryo-Freezing-Container*, Fisher Scientific GmbH; Schwerte) 15 min bei 4 °C aufbewahrt und im Anschluss für 48 Stunden bei -80 °C gelagert, bevor die Kryoröhrchen in eine Stickstofftonne überführt wurden.

4.5 Durchflusszytometrie

Im Vorfeld des aufwändigeren Nachweises von MRP 1 und MRP 3 auf RNA- und Proteinebene sollte mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) geklärt werden, ob MCF-7- und BT-474-Zellen grundsätzlich MRP 1 und 3 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dazu wurden die Zellen vor der durchflusszytometrischen Messung mit einem spezifischen, gegen MRP 1 bzw. MRP 3 gerichteten, Primärantikörper inkubiert, der durch einen zweiten, mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelten Antikörper erkannt wurde und so ein für FITC spezifisches Signal bei 519 nm erzeugte.

Während der Messung im Durchflusszytometer wird die Probe mittels Überdruck zur Durchflusszelle geleitet. Um zu verhindern, dass Zellen aus verschiedenen Richtungen oder mehrere Zellen zur gleichen Zeit die Durchflusszelle passieren, tritt am unteren Ende des Durchflusskanals ein Druckstrahl mit Mantelflüssigkeit ein und fließt im Probenfluss nach oben. Die Mantelflüssigkeit umgibt den Probenfluss, vermischt sich aber nicht mit diesem. Durch den Druck des Mantelflüssigkeitsstroms werden die Zellen im Probenstrom fokussiert, so dass sie ihn einzeln und nur in eine Richtung durchlaufen (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung). Ein von einem Argonlaser erzeugter Laserstrahl der Wellenlänge 488 nm tritt senkrecht in den Probenstrom ein und trifft auf die Zellen im Probenstrom. Zellen, die Fluoreszenzfarbstoffe gebunden haben, streuen das Licht und emittieren gleichzeitig Fluoreszenzlicht. Licht, das unter einem kleinen Winkel (1-16°) zur Achse des Laserstrahls gestreut wird, bezeichnet man als Vorwärtstreuung (Forward Scatter, FS). Licht, das

senkrecht zur Achse des Laserstrahls gestreut wird, wird als Seitwärtsstreuung (Side Scatter, SS) bezeichnet. Außerdem wird bei allen Winkeln zur Achse des Strahls Fluoreszenzlicht (FL) ausgesendet, das von fünf Sensoren (FL1-5) aufgenommen wird.

Die Vorwärtsstreuung ist proportional zur Größe der Zelle, während die Seitwärtsstreuung ein Maß für die Granularität der Zelle darstellt. Das Durchflusszytometer *FC 500* (Beckman Coulter; Krefeld) verfügt über 7 Sensoren, die ein Spannungsimpulssignal proportional zur Intensität des Lichtes, das die Zellen emittieren und damit auch zur Menge des gebundenen Antikörpers, erzeugen.

Vorbereitung der MCF-7- und BT-474-Zellen

Die MCF-7- bzw. BT-474-Zellen wurden, wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben, gewonnen. Es wurden 4 Ansätze mit jeweils 1×10^6 Zellen hergestellt: Zusätzlich zur Inkubation mit dem gegen MRP 1 bzw. MRP 3 gerichteten Primär- (Abcam; Cambridge, UK) und dem FITC-markierten Sekundärantikörper (Acris Antibodies GmbH; Hiddenhausen) wurden unbehandelte Zellen als Negativkontrolle, sowie ein ausschließlich mit FITC-markiertem Sekundärantikörper inkubierter Ansatz zum Nachweis unspezifischer Antikörperbindungen und damit unspezifischer Fluoreszenzsignale mitgeführt (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: In der Durchflusszytometrie verwendete Ansätze zum Nachweis von MRP 1 und MRP 3 in MCF-7- und BT-474-Zellen; angegeben sind die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper; zum Nachweis unspezifischer Antikörperbindungen wurden unbehandelte Zellen (Ansatz 1), sowie ein ausschließlich mit FITC-markiertem Sekundärantikörper inkubierter Ansatz (Ansatz 2) mitgeführt

Ansatz	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Nachweis von
1	-	-	Autofluoreszenz
2	-	FITC-gekoppelter-anit-mouse-Antikörper	unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers
3	mouse-anti-MRP1-Antikörper	FITC-gekoppelter-anit-mouse-Antikörper	MRP 1
4	mouse-anti-MRP3-Antikörper	FITC-gekoppelter-anit-mouse-Antikörper	MRP 3

Alle Reaktionen wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden in 100 µl PBS aufgenommen und 100 µl 2 %ige Formaldehydlösung (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) zur Fixierung der Zellen zugefügt. Nach einer 15minütigen Inkubationszeit bei 22 °C wurde die Reaktion durch Zusatz von 800 µl PBS und eine

5minütige Zentrifugation (200 g, 4 °C) beendet. Um die Zellen zu waschen, wurde das Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und 5min zentrifugiert (200 g, 4 °C). Dieser Schritt wurde wiederholt, bevor die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit 1 µg gegen MRP 1 bzw. MRP 3 gerichteten Primärantikörper für 1 Stunde auf Eis inkubiert wurden. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen im Anschluss 2mal gewaschen. Dazu wurde das Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und 5 min bei 200 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 µg FITC-markiertem Sekundärantikörper für 30 min im Dunkeln inkubiert. Um ungebundene Sekundärantikörper zu entfernen, wurden zwei Waschschrte mit je 500 µl FACS-Puffer und anschließender 5minütiger Zentrifugation (200 g, 4 °C) durchgeführt, bevor das Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen (*Polystyrene Round-Bottom Tube*, BD Bioscience; Heidelberg) überführt wurde.

Der verwendete FACS-Puffer setzte sich aus 0,2 % Tween20 (BioRad Laboratories GmbH; München) und 1 % BSA (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) in PBS (pH 7,4) zusammen. Der Zusatz von Tween20 zur Permeabilisation der Zellen war notwendig, um eine Bindung der für MRP 1 bzw. MRP 3 spezifischen Primärantikörper zu gewährleisten, da diese gegen innere Epitope von MRP 1 bzw. MRP 3 gerichtet waren.

Messung der MCF-7 und BT-474-Zellen

Direkt im Anschluss an die Präparation erfolgte die Analyse der Ansätze 1 bis 4 im Durchflusszytometer *FC500*. Die Signalstärke des verwendeten Fluorochroms FITC wurde im Sensor FL1 gemessen. Pro Ansatz wurde 50 000 Zellen erfasst. Für die Unterstützung bei der Durchführung der Messung wird MTLA Katrin Hornung (Arbeitsgruppe Herz-, Thoraxchirurgie; Universitätsklinikum Jena) gedankt.

Die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzsignale erfolgte mit der Software *MXP* (Beckman Coulter; Krefeld). Zur Verdeutlichung der Auswertung ist repräsentativ eine Messung von MRP 1 an BT-474-Zellen in Abbildung 3 dargestellt. Zur Auswertung wurden die gemessenen Daten als zweidimensionale Punktwolke (Abbildung 3 A, B, C, D) oder im Histogramm (Abbildung 3 E, F, G) mit dem Fluorochromsignal auf der X-Achse gegen die Zellzahl auf der Y-Achse dargestellt. Als Negativkontrolle wurden Zellen der entsprechenden Zelllinie ohne Primär- und ohne Sekundärantikörper mitgeführt, um die Autofluoreszenz, die durch Streuung von Laserlicht an Zellorganellen entsteht, von der zu messenden Fluoreszenz zu trennen. Dafür wurden in einem Punktwolkendiagramm Größe und Granularität der Zellen

durch Eingrenzung der Region Z detektiert (Abbildung 3A) und die Zellen dann in ein Histogramm gelegt (Abbildung 3 B), das die Fluoreszenz des gewählten Bereichs logarithmisch gegenüber der Zellzahl darstellt. Dabei wurde festgelegt, dass Werte, deren Fluoreszenz in den Fluoreszenzbereich der Negativkontrolle fällt, als Autofluoreszenz, Werte größer als dieser Bereich als eindeutige Fluoreszenz gelten.

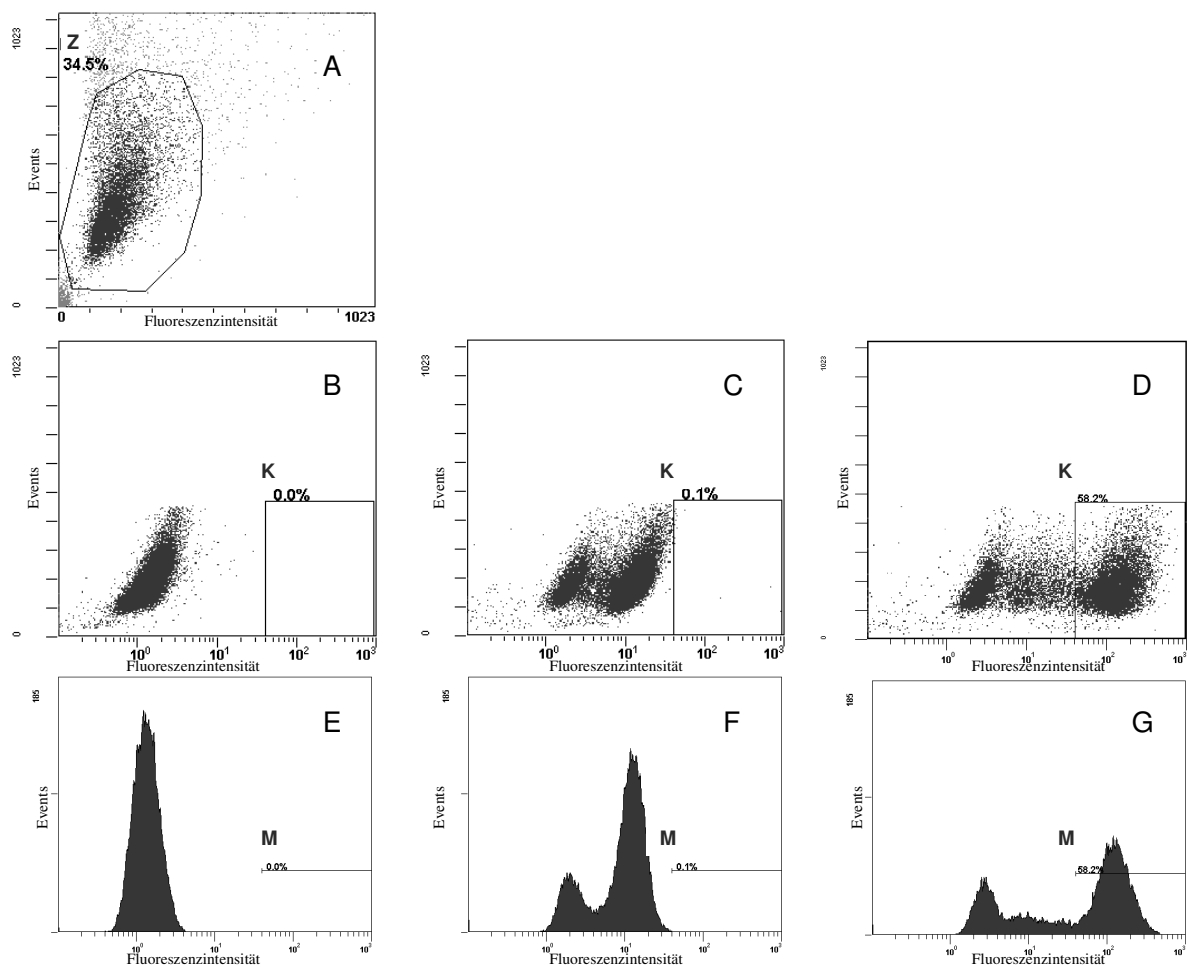


Abbildung 3: Repräsentative Messung von MRP 1 auf BT-474-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die im Vorwärtsscatter vermessenen Zellen (A) mit Einstellung der als vitale Zellen definierten Region Z und die im Seitwärts-Scatter vermessenen Zellen (B, C, D) sowie die dazugehörigen Histogramme (E, F, G) mit Definition der als MRP 1-positiv bezeichneten Region K bzw. M. Dabei sind die Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der jeweils gemessenen Events in der unbehandelten Kontrolle (B, E), in den nur mit FITC-markierten Sekundär-Antikörper markierten Zellen (C, F) und in den mit gegen MRP 1 gerichteten-Primär- und FITC-markierten Sekundär-Antikörper (D, G) inkubierten Zellen dargestellt.

Um unspezifische Bindungen des FITC-gekoppelten Sekundärantikörpers an Oberflächenstrukturen der Zellen nachzuweisen, wurden zusätzlich MCF-7- bzw. BT-474-Zellen nur mit Sekundär-, aber nicht mit dem gegen MRP 1 bzw. MRP 3 gerichteten Primärantikörper inkubiert (Abbildung 3 C, F). In diesem nur mit FITC-markierten Sekundärantikörper behandelten Ansatz wurde die für alle Messansätze identische Region M

(Abbildung 3 F) so gewählt, dass sie am Ende des absteigenden Schenkels des erhaltenen Fluoreszenzpeaks lag und weniger als 1 % der sich in diesem Bereich befindenden Zellen umfasste. Zellen, die ein Signal in der Region M lieferten, wurden als MRP 1- bzw. MRP 3-positiv definiert (Abbildung 3 D, G).

4.6 Nachweis von MRP1 und MRP3 auf RNA-Ebene

4.6.1 Optimierung der RNA-Isolation aus MCF-7- und BT-474-Zellen

Die Isolation von Ribonukleinsäure (RNA) aus MCF-7-Zellen wurde mittels Trizol[®]-Reagent (Invitrogen GmbH; Karlsruhe), sowie mittels High Pure RNA Isolation Kit (Roche diagnostics GmbH; Mannheim) durchgeführt und die Qualität im Anschluss mittels NanoDrop (*ND 1000*, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) beurteilt. Dazu wurden die Verhältnisse der ermittelten Absorptionen bei 230, 260 und 280 nm gebildet. Um Verunreinigungen mit Proteinen zu beurteilen, wurde die so genannte 260/280 – Ratio gebildet, die zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollte. Um Kontaminationen durch Guanidin-Isothiocyanat nachzuweisen, wurde die 260/230 – Ratio gebildet, die größer als 2 sein sollte.

4.6.1.1 Isolation von RNA mittels Trizol[®]-Reagent

Die Isolation von RNA mittels Trizol[®]-Reagent zum Nachweis von MRP 1 und MRP 3 in MCF-7-Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Trizol[®]-Reagent ist eine Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat, die die Zellen unter Erhalt der RNA-Integrität zerstört.

5×10^6 MCF-7-Zellen wurden mit 1 ml Trizol[®]-Reagent versetzt und 5 min bei 22 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 200 µl Chloroform (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) zugefügt, invertiert, bis sich die Phasen gemischt hatten und für 3 min bei 22 °C inkubiert, bevor die Suspension 15 min zentrifugiert wurde (12 000 g, 4 °C). Nach der Zentrifugation lagen drei Phasen vor: Eine obere, wässrige Phase, die die RNA enthielt, eine dünne mittlere Phase mit Proteinen und Zellresten, sowie eine rosafarbene untere Schicht, in der sich das Trizol[®]-Reagent und Chloroform befanden. Für das weitere Vorgehen wurde die obere Phase in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol p.a. (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) versetzt, um die organische Phase von noch vorhandenen Proteinen zu separieren. Die Lösung wurde invertiert, für 10 min bei 22 °C inkubiert und 10 min zentrifugiert (12 000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml 75 %igem Ethanol p.a. (Carl Roth

GmbH + Co. KG; Karlsruhe) resuspendiert und 5 min zentrifugiert (7 600 g, 4 °C), um noch vorhandene DNA-Reste zu entfernen. Nach erfolgter Trocknung des Pellets bei 22 °C wurde dieses in 20 µl RNase-freiem DEPC-Wasser (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) resuspendiert und für 10 min bei 55 °C im Thermomixer (*Eppendorf Thermomixer Comfort*, Eppendorf AG; Hamburg) inkubiert. Im Anschluss konnte die enthaltene RNA-Konzentration mittels NanoDrop ermittelt werden.

4.6.1.2 Isolation von RNA mittels High Pure Isolation Kit

Die RNA-Isolation mittels High Pure RNA-Isolation Kit zum Nachweis von MRP 1 und MRP 3 in MCF-7- und BT-474-Zellen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Roche diagnostics GmbH; Mannheim). Die beschriebenen Reaktionen erfolgten, wenn nicht anders beschrieben, im Filter Tube. Die Flüssigkeit im Collection Tube wurde jeweils verworfen.

1x10⁶ MCF-7- bzw. BT-474-Zellen wurden in 200 µl PBS suspendiert. 400 µl Lysepuffer wurden zur Suspension zugefügt und 15 sec auf dem Vortex-Genie 2 (*Vortex Genie 2 G560E*, Fisher Scientific GmbH; Schwerte) gemischt, bevor die Suspension im Filter Tube 15 sec bei 8000 g (22 °C) zentrifugiert wurde. Um die Hydrolyse von DNA in kürzere Molekülketten zu katalysieren und so eine Amplifikation von DNA in späteren Schritten zu verhindern, wurden 10 µl DNase I und 90 µl DNase I Inkubationspuffer zugegeben und 15 min bei 22 °C inkubiert. Um Zelltrümmer zu entfernen, wurde mit 500 µl Waschpuffer I gewaschen und bei 8000 g (15 sec, 22 °C) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500 µl Waschpuffer II (8000 g, 15 sec, 22 °C) und im Anschluss mit 200 µl Waschpuffer II (13000 g, 2 min, 22 °C) wiederholt, bevor das Filter Tube in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und mit 50 µl Elutionspuffer versetzt wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei 8000 g (1 min, 22 °C). Die sich nun im Eppendorfgefäß befindende RNA wurde direkt für die Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop eingesetzt und anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

4.6.2 Reverse Transkription

Aus der zuvor isolierten, labilen mRNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase die dazu komplementäre, stabilere cDNA (complementary Deoxyribonucleic acid) synthetisiert, um anschließend eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von MRP 1 und MRP 3 durchzuführen. Zur Herstellung der cDNA wurde in der vorliegenden Arbeit ein cDNA-Synthese-Kit (*Omniscript RT Kit*, Quiagen GmbH; Hilden) verwendet. Die Durchführung

erfolgte auf Eis und nach Angaben des Herstellers. Es wurde der in Tabelle 11 aufgeführte Reaktionsmix hergestellt, kurz gevortext und anschließend bei 37 °C für 60 min im Thermocycler (*Primus 25 advanced*, PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen) amplifiziert.

Tabelle 11: Für die Synthese von cDNA zum Nachweis von MRP 1 und 3 verwendeter Reaktionsmix

Substanz	Einsatzvolumen	Endkonzentration
10x Buffer RT	2 µl	1x
dNTP Mix (5mM)	2 µl	0,5mM
Oligo-dT Primer (10µM)	2 µl	1µM
RNase-Inhibitor (10 units/µl)	1 µl	10 units/20 µl
Omniscript Reverse Transkriptase (4 units/µl)	1 µl	4 units/20µl
Template RNA (1µg/µl)	x µl	50 ng/µl
DEPC-Wasser	ad 20 µl	

4.6.3 RT-PCR

Zur Vervielfältigung (Amplifikation) von Nukleinsäuresequenzen, die für GAPDH, MRP 1 und MRP 3 spezifisch sind, wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Da die cDNA durch Reverse Transkription gewonnen wurde, spricht man in diesem Fall von einer RT-PCR. In einem initialen Schritt der Denaturierung wird dabei die DNA auf 99 °C erhitzt und so die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen der komplementären DNA-Stränge aufgebrochen. Während des nun folgenden Annealing-Schrittes lagern sich die für das zu amplifizierende Produkt spezifischen Nukleinsäuresequenzen (Primer) bei der für sie charakteristischen Temperatur an den DNA-Strang an. Im abschließenden Schritt der Elongation setzt die thermostabile DNA-Polymerase am 3'-Ende des Primers an und synthetisiert Nukleotide an den DNA-Einzelstrang, so dass als Ergebnis der PCR DNA-Doppelstränge erhalten werden. Durch 20-30 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation werden die entstehenden DNA-Fragmente exponentiell vervielfältigt.

Um Schwankungen in der für die cDNA-Synthese eingesetzten RNA-Menge feststellen und später herausrechnen zu können, wurden zusätzlich für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) spezifische Sequenzen amplifiziert. Bei GAPDH handelt es sich um ein Gen des Energiestoffwechsels, das konsitutiv, also weitgehend unabhängig von äußeren Einflüssen, exprimiert wird. Schwankungen in der Stärke des GAPDH-Nachweises können daher ein Hinweis auf einen ungleichen Probenauftrag sein. Für die Amplifikation von

MRP 1, MRP 3 und GAPDH wurden die in Tabelle 5 aufgeführten Primer (JenaBioscience GmbH; Jena) nach dem in Tabelle 12 dargestellten Ansatz verwendet.

Tabelle 12: Für die PCR von MRP 1, MRP 3 und GAPDH verwendeter Reaktionsansatz.

Substanz	Einsatzvolumen
Red Load Taq Master Mix (5x)	12,5 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	1 µl
cDNA	2 µl (MRP 1 u. 3), 1µl (GAPDH)
DEPC-Wasser	ad 25 µl

Die PCR erfolgte im Thermocycler bei einer für die Annealing-Temperatur des entsprechenden Primers charakteristischen Temperatur (siehe Tabelle 13 für MRP 1 und 3 und Tabelle 14 für GAPDH).

Tabelle 13: Zur Amplifikation von MRP 1 und MRP 3 verwendetes Programm im Thermocycler (modifiziert nach Schrenk et al. 2001)

	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initialer Schritt	95	1 min	1 x
	61	30 s	
	72	30 s	
Denaturierung	95	30 s	30 x
Annealing	61	30 s	
Elongation	72	30 s	
Finale Elongation	72	5 min	1 x

Tabelle 14: Zur Amplifikation von GAPDH verwendetes Programm im Thermocycler (modifiziert nach Lisy 2003)

	Temperatur in °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initialer Schritt	95	1 min	1 x
Denaturierung	95	30 s	20 x
Annealing	66	30 s	
Elongation	72	30 s	
Finale Elongation	72	10 min	1 x

4.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung der PCR-Produkte (MRP 1, MRP 3 und GAPDH) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes bewegen sich die negativ geladenen Nukleinsäurestränge in einem Gel aus Agarosepolymeren zur Anode, wobei sich kleinere Fragmente schneller durch das Gel bewegen können und so eine Trennung nach der Größe der erhaltenen Nukleinsäurefragmente ermöglicht wird. Durch Zusatz von Ethidiumbromid wird eine Visualisierung möglich, da sich dieses in die DNA einlagert und im ultravioletten Licht zur Fluoreszenz angeregt wird.

Zur Durchführung wurde ein 1,5 %iges Agarosegel in TAE-Puffer gegossen und mit Ethidiumbromid (1:20000) (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) versetzt. Nach Auspolymerisierung des Gels wurde dieses mit TAE-Puffer übergossen und mit jeweils 25 µl der cDNA-Produkte und 7 µl einer 100 bp-DNA-Leiter (*linear scale*, JenaBioscience GmbH; Jena) zum Abschätzen der Fragmentgröße bestückt. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 45 min bei 100 V. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte im Image Master[®] VDS (Pharmacia Biotech GmbH; Freiburg). Zur semiquantitativen Auswertung der Banden wurde das Programm Gene Tools (Syngene, Cambridge, UK) verwendet.

4.7 Nachweis von MRP 1 und MRP 3 auf Proteinebene

Um die 17-Transmembrandomänen-Transporter MRP 1 und MRP 3 aus MCF-7- bzw. BT-474-Zellen zu isolieren, wurden die Gesamt- bzw. Membranproteinisolation mittels RadioImmunoPräzipitationsAssay(RIPA)-Puffer, *ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit*, *Mem-PER[®] Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit*, Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation, sowie einer detergentienbasierten Methode durchgeführt. Zur Beurteilung der Anwendbarkeit der verwendeten Methoden für die Isolation von MRP 1 bzw. MRP 3 aus MCF-7-Zellen wurde in mindestens 3 unabhängigen Versuchsdurchführungen der Proteingehalt der jeweils erhaltenen Proteinlösungen ermittelt und das Ergebnis mittels SDS-PAGE und sich anschließender Immunodetektion überprüft. Zur Beurteilung des Molekulargewichts wurde neben einem Proteinstandard ein reines MRP 1- bzw. MRP 3-Protein mitgeführt. Da MRP 1 und MRP 3 zur gleichen Proteinfamilie gehören und eine ähnliche Struktur aufweisen (Bakos und Homolya 2007), wurden die im Folgenden beschriebenen Optimierungsschritte ausschließlich für MRP 1 durchgeführt.

Um die Proteine vor einem Abbau durch Serin-, Cystein- und Metalloproteasen zu schützen, wurde direkt vor dem Einsatz allen verwendeten Reagenzien ein Proteaseinhibitorcocktail (*Complete mini*, Roche diagnostics GmbH; Mannheim) im Verhältnis 1:7 zugesetzt.

4.7.1 Optimierung der Gesamt- und Membranproteinisolation aus MCF-7- und BT-474-Zellen

4.7.1.1 Gesamtproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels RIPA-Lysepuffer

Grundlage der Gesamtproteinextraktion mittels RIPA – Puffer ist eine Lyse der Zellen im RIPA-Puffer mit einer sich anschließenden Trennung von Zellkernen und –trümmern von den isolierten Proteinen durch einen Zentrifugationsschritt. Zur Isolation von MRP 1 und MRP 3 aus MCF-7-Zellen wurde der RadioImmunoPräzipitationsAssay (RIPA) – Puffer (Ngoka 2008) verwendet. 1×10^6 Zellen wurden in 100 μ l RIPA-Lysepuffer aufgenommen. Um die Zellsuspension zu homogenisieren, wurde diese 1 min im Ultraschallbad (*Sonorex Super RK52H*, Bandelin; Berlin) behandelt und für 30 sec auf Eis gestellt. Nachdem dieser Schritt 2mal wiederholt wurde, wurden die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss 30 min zentrifugiert (10 000 g, 4 °C). Durch diesen Zentrifugationsschritt wurden die Proteine von Zelltrümmern und -kernen separiert. Die sich im Überstand befindenden Proteine wurden bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis bzw. langfristig bei -20 °C gelagert.

4.7.1.2 Membranproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit

Grundlage der Membranproteinextraktion mittels ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit (Fermentas GmbH; Leon-Rot) ist eine pufferbasierte Permeabilisation der Zellen mit einer sich anschließenden Trennung von cytosolischen und membranständigen Proteinen durch Lyse in hydrophilem bzw. hydrophobem Puffer und einer folgenden Zentrifugation. Zur Isolation von MRP 1 und MRP 3 aus MCF-7-Zellen wurden 5×10^6 Zellen in 3 ml Waschlösung (*ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit*, Fermentas GmbH; Leon-Rot) resuspendiert und anschließend 5 min bei 250 g (4 °C) zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Dieser Schritt wurde mit 1,5 ml Waschlösung wiederholt, bevor zur Permeabilisation der Zellen 1,5 ml Permeabilisationspuffer (*ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit*, Fermentas GmbH; Leon-Rot) zugefügt und die Zellsuspension 10 min (0 Upm,

4 °C) auf dem Thermomixer (*Eppendorf Thermomixer Comfort*, Eppendorf AG; Hamburg) inkubiert wurde. Um die zytosolischen Proteine zu extrahieren, schloss sich eine 15minütige Zentrifugation bei 16000 g bei 4 °C an. Der Überstand, welcher die zytosolische Fraktion enthielt, wurde bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 ml Membranprotein-Extraktionspuffer (*ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit*, Fermentas GmbH; Leon-Rot) resuspendiert, 30 min bei 1400 Upm auf dem Thermomixer inkubiert (4 °C) und 15 min bei 16000 g (4 °C) zentrifugiert. Die sich im Überstand befindenden Membranproteine wurden bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis bzw. bei -20 °C gelagert.

4.7.1.3 Membranproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit

Um die membranständigen Proteine MRP 1 und MRP 3 aus MCF-7-Zellen zu isolieren, wurde das Mem-Per® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent-Kit (Fisher Scientific; Schwerte) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Grundlage dieses Kits ist eine pufferbasierte Permeabilisation der Zellen mit einer sich anschließenden Trennung von cytosolischen und membranständigen Proteinen durch Herstellung eines membranähnlichen Milieus mittels spezifischer Puffersysteme, Wärme und Zentrifugation. 5×10^6 Zellen wurden zum Entfernen von Zelltrümmern 2 min bei 850 g (22 °C) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl Reagenz A (*Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit*, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) resuspendiert und für 10 min bei 22 °C inkubiert. 300 µl Reagenz C (*Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit*, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) wurden mit 150 µl Reagenz B (*Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit*, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) versetzt, zur Zellsuspension zugefügt und 30 min auf Eis inkubiert, wobei die Inkubationszeit nach jeweils 5 min durch kurzes Vortexen unterbrochen wurde. Nach Ende der Inkubationszeit wurde 3 min bei 10000 g °C (4 °C) zentrifugiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 37°C im Wasserbad erhitzt und bei 10000 g zentrifugiert (2 min, 22 °C), um Membranproteine von der cytosolischen Fraktion zu separieren (obere Phase: hydrophile Komponenten, untere Phase: hydrophobe Bestandteile). Beide Phasen wurden schnellstmöglich separiert und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

4.7.1.4 Membranproteinextraktion mittels Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation

Zur Isolation von MRP 1 und MRP 3 aus MCF-7-Zellen wurde die Methode der Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation nach Lund et al. (Lund et al. 2009) modifiziert. Bei der Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation werden die Zellen zunächst mit einem hypotonen Puffer lysiert, anschließend homogenisiert und in zwei Zentrifugationsschritten von Zelltrümmern und -kernen getrennt. Bei der sich anschließenden Dichtegradientenzentrifugation werden die Makromoleküle in einem Gradienten aus Percoll und Sucrose gemäß ihrer Dichte getrennt. Die Zellbestandteile sedimentieren im Gradienten solange, bis ihre Dichte die Dichte des Lösungsmittels erreicht hat. Dabei hängt die Geschwindigkeit der Sedimentation vom Dichteunterschied zwischen Probe und Lösungsmittel, der Winkelgeschwindigkeit des Rotors, der Viskosität des Lösungsmittels und den Moleküleigenschaften ab (Pertoft 2000).

Zur Lyse wurden 1×10^7 MCF-7-Zellen in 500 μ l hypotonem Puffer 5 min bei 4°C inkubiert. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 200 g (4 °C) wurde das Zellpellet in 500 μ l Gradientenpuffer resuspendiert und durch Behandlung im Ultraschallhomogenisator (25 strokes, 1 stroke/sec, 30% Power) (*Sonoplus UW 2200*, Bandelin; Berlin) homogenisiert. Durch Zentrifugation (1000 g, 10 min, 4 °C) konnten Zellkerne und -trümmer von den Proteinen separiert werden. Der Überstand wurde in einem Zentrifugenröhrchen (11 x 60 mm, Beckman Coulter; Krefeld) auf 3 ml mit Gradientenpuffer aufgefüllt, um ein Kollabieren der Zentrifugenröhrchen zu vermeiden. Diese Lösung wurde 30 min bei 100000g (4 °C, acceleration/ deceleration = 9/7) in der Ultrazentrifuge (*Optima XL-100K*, Beckman Coulter; Krefeld) mit dem Einschwingrotor *Sw-60Ti* (Beckman Coulter; Krefeld) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 3 ml Gradientenpuffer resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Pellet wurde in 2 ml Gradientenpuffer resuspendiert und ein Gemisch aus 1,9 ml Percoll (GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg), 190 μ l PBS, pH und 190 μ l 2,5M Sucrose (Sigma-Aldrich GmbH; München) (frisch hergestellt) zugegeben. Anschließend wurde die Suspension 15 min bei 120000 g (4 °C, acceleration/ deceleration = 9/1) zentrifugiert, wodurch 3 Phasen erhalten wurden, die separiert und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert wurden.

Entfernen des Percolls

Um störende Einflüsse des Percolls auf die gelelektrophoretische Trennung der Proteinextrakte zu minimieren, wurde die Proteinlösung (Phase am Boden) 3mal mit

Gradientenpuffer gewaschen. Dazu wurde jeweils 15 min bei 7 500 g (4 °C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl Gradientenpuffer aufgenommen. Anschließend wurde das Pellet in 90 µl Gradientenpuffer resuspendiert und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis gelagert.

Konzentrierung des Proteingemisches mittels Ultrafiltrationsröhrchen

Für die Konzentrierung mit Ultrafiltrationsröhrchen (*Amicon Centrifugal Filter Units*, Millipore, Schwalbach) wurde die Proteinsuspension auf ein Filtertube (Molekulargewichtsgrenze: 100 kDa) geladen und im Anschluss 20 min bei 14000 g (4 °C) zentrifugiert. Während die partikulären Bestandteile den Filter nicht passieren konnten, wurden so die wässrigen Bestandteile aus der Lösung entfernt. Durch 2minütige Zentrifugation (1000 g, 4 °C) des in ein Eppendorf-Cup invertierten Filtertube wurden die partikulären Bestandteile vom Filter gelöst und bis zur weiteren Verwendung auf Eis bzw. bei -20°C gelagert. Es schloss sich eine Proteinkonzentrationsbestimmung mittels NanoDrop (*ND 1000*, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) an.

Vakuum-Konzentrierung des Proteingemisches

Um viele Proben gleichzeitig konzentrieren zu können, wurden die nach der Gradientenzentrifugation erhaltenen Proteingemische bei 37 °C im Vakuumkonzentrator (*Speed Vac SPD111V*, Fisher Scientific GmbH; Schwerte) mit angeschlossener Vakuumpumpe (*Gel Pump GP110*, Fisher Scientific GmbH; Schwerte) 6 – 8 Stunden bis zu einem Endvolumen von 100 µl konzentriert. Die Proteinkonzentrationen wurden im Anschluss mittels NanoDrop (*ND 1000*, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) bestimmt.

4.7.1.5 Detergentienbasierte Membranproteinextraktion

Für die Isolation der Membranproteine MRP 1 und MRP 3 aus MCF-7- und BT-474-Zellen wurde die Methode nach Vellonen et al. (2010) modifiziert. Diese Methode basiert auf dem Zusatz von Detergentien (Triton X-100) zum Lysepuffer, die sich in die integralen Membranproteine einlagern, so die Biomembran ersetzen und eine Stabilität der Proteine während der weitem Verarbeitung gewährleisten. Zur Proteinisolation wurden 7×10^6 Zellen in 120 µl Lysepuffer aufgenommen und durch Auf- und Abpipettieren homogenisiert. Die Zellsuspension wurde 30 min auf Eis inkubiert. Direkt im Anschluss folgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 10000 g (4 °C), um Zelltrümmer und -kerne zu sedimentieren. Die sich

nun im Überstand befindenden Proteine wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis bzw. langfristig bei -20 °C gelagert.

4.7.2 Vergleich der Gesamt- und Membranproteinbestimmung aus MCF-7- und BT-474-Zellen

Zur Ermittlung der Störanfälligkeit unterschiedlicher Proteinbestimmungsmethoden gegenüber den verwendeten Proteinisolationspuffern, wurden die mit den in Abschnitt 4.7.1 erläuterten Methoden gewonnenen Proteinlösungen indirekt photometrisch mittels Bradford-Reagenz und quantiPro-BCA-Assay (Sigma-Aldrich GmbH; München), sowie direkt mittels NanoDrop (*ND 1000*, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) photometrisch vermessen. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Immunodetektion von GAPDH, wie in den Abschnitten 4.7.3 und 4.7.4 beschrieben, durchgeführt. Bei einer störungsfreien Bestimmung des Proteingehalts sollten die aus unabhängigen Proben erhaltenen GAPDH-Banden die gleiche Intensität aufweisen, da GAPDH als konstitutiv exprimiertes Protein gilt.

4.7.2.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts mit der Methode nach Bradford

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts in Proteinlösungen, die aus MCF-7- und BT-474-Zellen gewonnenen wurden, wurde die Methode nach Bradford (Bradford 1976) modifiziert durchgeführt. Zur Proteinbestimmung wurde der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliantblau G-250 verwendet, der ein Absorptionsmaximum bei 465 nm im ungebundenen Zustand besitzt. Dieses Absorptionsmaximum verschiebt sich durch Ausbildung von Protein-Farbstoff-Komplexen zu einer Wellenlänge von 595 nm, was photometrisch gemessen werden kann. Die Auswertung erfolgte mittels einer Kalibriergeraden bovinem Serumalbumin (BSA) im Bereich von 0,91 – 9,09 µg BSA/ml Bradford-Reagenz.

Die Proteinlösungen wurden mit Aqua dest. entsprechend verdünnt und mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt, so dass die ermittelten Absorptionen im linearen Bereich der Kalibriergeraden lagen. Sowohl die Messungen für die Kalibriergerade, als auch die Vermessung der isolierten Proteine erfolgten als Dreifachbestimmung nach 10 bis 30 minütiger Inkubation bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektrophotometer (*Ultrospec 3300 pro*, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg).

4.7.2.2 Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels quantiPro-BCA-Assay

Grundlage der Proteinbestimmung mittels Bicinchinon-Säure (BCA) im quantiPro-BCA-Assay (Sigma-Aldrich GmbH; München) ist die Bildung eines Komplexes zwischen Proteinen und Cu^{2+} -Ionen (Biuret-Reaktion). Durch die Seitenketten von Tryptophan, Tyrosin, Cystein und durch die Peptidbindung werden proportional zur anwesenden Proteinmenge die Kupferionen dieses Komplexes zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit BCA einen violetten Farbkomplex (Absorption bei 562 nm) bilden.

Die Durchführung erfolgte in Dreifachbestimmung in einer 96-Wellplatte (*96 Well Polystyrol Microplatte, transparent*, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) nach Herstellerangaben. Zur Kalibrierung wurde eine Kalibriergerade mittels BSA im Bereich von 5 – 25 μg BSA/ml Aqua dest. erstellt. Von der zu vermessenden Proteinlösung wurde eine 1:200-Verdünnung in Aqua dest. hergestellt, so dass die ermittelten Absorptionen im linearen Bereich der Kalibriergeraden lagen. Es wurden 100 μl dieser Verdünnung je Well eingesetzt. Weiterhin wurden 100 μl eines Gemisches aus 25 Teilen Reagenz A, 25 Teilen Reagenz B und 1 Teil Reagenz C (*QuantiPro BCA Assay Kit*, Sigma-Aldrich GmbH; München) je Well zugefügt. Die 96-Wellplatte wurde 2 h bei 37 °C inkubiert und nach einer 30minütigen Abkühlungszeit auf 22 °C im Mikroplatten-Reader (*Tecan Sunrise Basic*, Tecan Deutschland GmbH; Crailsheim) bei 562 nm vermessen.

4.7.2.3 Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels NanoDrop

Bei der Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels NanoDrop (*ND 1000*, Fisher Scientific GmbH, Schwerte) handelt es sich um eine direkte photometrische Proteinbestimmung, bei der die Absorptionsmaxima direkt, also ohne Verschiebung durch Zusatz weiterer Substanzen, gemessen werden. Grundlage der photometrischen Messung bei 280 nm ist die ausgeprägte Absorption der Seitenketten aromatischer Aminosäuren im Bereich von 260 bis 280 nm. Diese Absorption kann als Richtwert für den Proteingehalt einer Lösung verwendet werden. Für die in einer Dreifachbestimmung durchgeführte Messung wurde jeweils 1 μl der zu untersuchenden Proteinlösung im Nanodrop (280 nm) vermessen.

4.7.3 Optimierung der SDS-PAGE

Proteine besitzen entsprechend ihrer Aminosäurezusammensetzung eine spezifische Ladung nach der sie im elektrischen Feld mittels Elektrophorese getrennt werden können. Dem Probenpuffer wurde das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt, das sich an die Aminosäuren anlagert und so den Proteinen aufgrund der negativen Sulfatgruppen eine nach außen negative Ladung verleiht. Die Eigenladung der Proteine wird dadurch vernachlässigbar und die Proteine werden nun proportional zum Logarithmus ihres relativen Molekulargewichts getrennt (sogenannter Molekularsiebeffekt). Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode der diskontinuierlichen Gelelektrophorese handelt es sich um eine Sonderform der SDS-PAGE, bei der dem eigentlichen Trenngel ein Sammelgel mit größeren Poren vorgeschaltet wird. Dabei können auch bei großen Probenvolumina scharfe Banden erhalten werden, da die Proteine durch den Einsatz entsprechender Puffersysteme zunächst an der Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel konzentriert und anschließend im Trenngel separiert werden.

Gelherstellung

Zur Trennung der Proteine MRP 1 und MRP 3 wurden ein 8- bzw. 10 %iges Trenn- und ein 4,3 %iges Sammelgel verwendet. Zur Gelherstellung wurden die in Tabelle 15 aufgeführten Substanzen eingesetzt.

Tabelle 15: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-PAGE zur anschließenden Immunodetektion von MRP 1 und MRP 3; AA/BAA, Acrylamid/ Bisacrylamid; APS, Ammoniumpersulfat; TEMED, NNN'N'-Tetramethylethyldiamin

Trenngel	8%	10%	Sammelgel	4,3%
30% AA/BAA	2,667 ml	3,333 ml	30% AA/BAA	0,717 ml
4x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2x Sammelgelpuffer	2,5 ml
Aqua dest.	4,733 ml	4,067 ml	Aqua dest.	1,728 ml
10% APS	100 µl	100 µl	10% APS	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	TEMED	5 µl

Durch Zusatz von NNN'N'-Tetramethylethyldiamin (*TEMED*, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) und Ammoniumpersulfat (*APS*, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) wurde die Auspolymerisation des Acrylamids (*Rotiphorese NR-Acrylamid/Bis 30% (29:1)*, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) katalysiert. Zum Gießen des Gels wurde zuerst die Trenngellösung pipettiert (ca. $\frac{3}{4}$ der Laufstrecke) und nach dessen Auspolymerisation das

Sammelgel (restliche Laufstrecke), welches die Probentaschen enthielt, hergestellt. Die vollständige Auspolymerisation des Gels erfolgte mit feuchten Tüchern bedeckt über Nacht bei 22 °C. Die elektrophoretische Trennung der Gesamtproteinextrakte (Elektrophoresekammer *PerfectBlue™ Twin S (45-1010i)*, Peqlab Biotechnologie GmbH; Erlangen) fand in Elektrophoresepuffer statt.

Vorbereitung von Gesamtprotein

Die mit den verschiedenen Isolationsmethoden gewonnenen Gesamtproteingemische (30 und 100 µg) wurden 1:2 mit 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95 °C und 500 Upm für 5 min im Thermomixer (*Eppendorf Thermomixer Comfort*, Eppendorf AG; Hamburg) inkubiert, um Wasserstoffbrückenbindungen zu spalten und somit Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen. Um die Disulfidbrücken optimal zu spalten, wurde dem Probenpuffer Dithiothreitol (*DTT*, Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) zugesetzt. Zur Trennung wurden die denaturierten Proteingemische in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Zusätzlich wurden 7 µl eines Größenmarkers (40 – 300 kDa, *PageRuler Multicolor High Range Protein Ladder*, Fermentas GmbH; Leon-Rot) eingesetzt, der aus Proteinen bekannter Größe bestand und damit ein Abschätzen der Proteingrößen im jeweiligen Gemisch ermöglichte. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V solange durchgeführt, bis die Bromphenolfront, die schneller als die Proteine wanderte, den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Bei der parallelen Durchführung von 2 Gelen wurde die angelegte Spannung auf 120 V erhöht. Zur Immunodetektion von MRP 1 und MRP 3 wurden zudem gereinigte Proteine (*Human MRP1-membranes*, *Human MRP3-membranes*, BD Biosciences; Heidelberg) als Größenstandard in den Mengen 0,2; 0,4 und 0,6 µg mitgeführt.

Optimierungsschritte

Um die Trennung der Membranproteine MRP 1 und MRP 3 zu verbessern, wurden verschiedene Optimierungsschritte durchgeführt, die im Folgenden aufgelistet sind. Dabei wurden die Ergebnisse der jeweiligen Optimierungsschritte mittels Immunodetektion, wie in Abschnitt 4.7 beschrieben, überprüft und die Bandenqualität evaluiert.

1. Zur Bestimmung der Proteinmenge, die mittels Immunodetektion gut detektierbar ist, wurden für die reinen Proteine MRP 1 und MRP 3 (*Human MRP1-membranes*, *Human MRP3-membranes*, BD Biosciences; Heidelberg) Verdünnungsreihen angefertigt und nach SDS-Page und Immunodetektion die Konzentrationen bestimmt, die sich im linear ansteigenden Signalbereich befanden.

2. Zur Ermittlung der optimalen Trenngelkonzentration wurden ein 8 und ein 10 %iges Trenngel mit identischer Gesamtproteinkonzentration angefertigt und die Bandenschärfe nach Detektion von MRP 1 beurteilt.
3. Um eine Zerteilung des Proteins in Untereinheiten durch Pufferzusätze ausschließen zu können, wurde SDS-Probenpuffer mit und ohne den Zusatz von β -Mercaptoethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe), das für die Spaltung von Disulfidbrücken verantwortlich ist, eingesetzt. Außerdem wurde ein Puffer ohne den Zusatz des denaturierenden Dithiothreitol (DTT) evaluiert.
4. Um den Einfluss des Erhitzens (Spaltung von Sekundär- und Tertiärstrukturen) auf die Stabilität der Membranproteine MRP 1 und MRP 3 zu evaluieren, wurden die Gesamtproteingemische bei 72 bzw. 95 °C für 5 min und 500 Upm auf dem Thermomixer erhitzt bzw. für 15 min bei 22 °C inkubiert bevor sie in die SDS-PAGE eingesetzt wurden.
5. Um die störenden Einflüsse der Elektrophoresebedingungen auf die Qualität der Trennung zu untersuchen, wurden verschiedene Gele angefertigt und die Elektrophorese bei 60, 80 bzw. 120 V durchgeführt.

4.7.4 Optimierung des Western-Blottings

Direkt im Anschluss an die gelelektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte ein Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran mittels Western Blotting, um ein Diffundieren der Proteine aus dem Polyacrylamidgel zu verhindern. Dabei wurde mit dem Semi-Dry-Verfahren (Kyhse-Andersen 1984) gearbeitet. Dazu wurden 3 mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) luftblasenfrei in der Elektroblothingapparatur (*PerfectBlueTM*, Modell SEDEC M, PEQLAB Biotechnologie GmbH; Erlangen) platziert und die PVDF-Membran (Roche diagnostics GmbH; Mannheim) 3 sec in Methanol (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) und anschließend für 5 – 10 min in Transferpuffer äquilibriert, bevor sie auf den Filterpapieren platziert wurde. Nun wurde das vom Sammelgel separierte und mit Transferpuffer benetzte Trenngel ebenfalls luftblasenfrei auf die Membran gelegt und mit 3 weiteren in Transferpuffer äquilibrierten Filterpapieren luftblasenfrei überschichtet. Nach Entfernung überschüssigen Transferpuffers wurde die Apparatur verschlossen und senkrecht zum Polyacrylamidgel ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die aufgrund der Anlagerung von SDS negativ geladenen Proteine aus dem Gel (-) in Richtung PVDF-Membran (+) wanderten und an dieser aufgrund hydrophober

Wechselwirkungen haften blieben. Die Durchführung erfolgte für 100 min bei 130mA bzw. beim parallelen Blotten von zwei Gelen für 100 min bei 180 mA.

Optimierungsschritte

Zur Optimierung der Banden war es zusätzlich nötig, das Blotting-Verfahren zu verändern. Methanol und SDS können die Qualität der Immunodetektion deutlich verschlechtern. Daher kann vor dem Blotten des Gels dieses in Aqua bidest. äquilibriert werden. Zur Überprüfung des Einflusses des Äquilibrierens wurden die PVDF-Membran nach erfolgter Benetzung mit Methanol und das Polyacrylamid-Gel für 10 min in Aqua bidest. (Millipore GmbH; Schwalbach/ Ts) und danach für 10 min in Transferpuffer äquilibriert, bevor sie in der Apparatur platziert wurden. Das Ergebnis wurde mittels Immunodetektion, wie in Abschnitt 4.7.5 beschrieben, überprüft und die Bandenqualität evaluiert. Zur Optimierung der Blotzeit wurde zwischen 90 und 120 min geblottet. Außerdem wurde die Stromstärke zwischen 140 und 220 mA variiert.

4.7.5 Optimierung des spezifischen Nachweises von MRP 1 und MRP 3 mittels Immunoblotting

Alle Schritte der im Folgenden beschriebenen Immunodetektion wurden, wenn nicht anders beschrieben, auf dem Taumelmischer (*Heidolph Polymax 2040*, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach) bei 22 °C mit einem Neigungswinkel von 10° und einer Geschwindigkeit von 21 Upm in einem Volumen von 10 ml in Gelfärbeschalen (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe) durchgeführt. Als Waschpuffer wurde PBS (pH 7,4) mit 0,1 % Tween20 (BioRad Laboratories GmbH; München) versetzt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach erfolgtem Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurde die Membran in Gelfärbeschalen für 1 Stunde in Blockpuffer II inkubiert, um die freien Proteinbindungsstellen auf der PVDF-Membran zu blockieren und so unspezifischen Antikörperreaktionen vorzubeugen. Nach Entfernen der Blocklösung wurde die Membran für 1 Stunde mit dem in Verdünnungspuffer II entsprechend Tabelle 16 verdünnten Primärantikörper inkubiert. Den für 1 h bei 22 °C durchgeführten Inkubationsschritten mit Block- bzw. Primärantikörper-Lösung war eine Inkubation bei 4 °C über Nacht äquivalent.

Tabelle 16: Zur Immunodetektion von MRP 1 und MRP 3 verwendete Primärantikörper mit Angabe von Hersteller, Ursprungsspezies und eingesetzter Verdünnung in 0,1fachem Roti®-Block

Zielstruktur	Ursprungsspezies	Hersteller	Verdünnung
GAPDH	Hase	(sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg)	1:1000
MRP 1	Maus	(<i>MRPm5</i> , Abcam; Cambridge, UK)	1:200
MRP 1	Maus	(<i>clone QCRL-1</i> , Sigma-Aldrich GmbH; München)	1:2000
MRP 3	Maus	(<i>M3II-21</i> , Abcam; Cambridge, UK)	1:200

Um die ungebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran 3mal für jeweils 5 min mit Verdünnungspuffer II gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des gegen den Primärantikörper gerichteten, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten und in Waschpuffer verdünnten Sekundärantikörpers entsprechend Tabelle 17 für 1 h. Im Anschluss wurde die Membran einmalig 10 min mit Verdünnungspuffer II gewaschen, um ungebundene Sekundärantikörper abzuwaschen. Um Interaktionen zwischen der Block-Substanz und dem Lumineszenzsubstrat zu reduzieren, erfolgte außerdem ein 3maliges Waschen mit Waschpuffer für jeweils 10 min.

Tabelle 17: Zur Immunodetektion von MRP 1, MRP 3 und GAPDH verwendete Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper mit Angabe von Verdünnung, Hersteller, Ziel- und Ursprungsspezies

Zielspezies	Ursprungsspezies	Hersteller	Verdünnung
Maus	Ziege	(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; bezogen über dianova GmbH; Hamburg, Deutschland)	1:2 500
Hase	Ziege	(Jackson ImmunoResearch/ Abcam; Cambridge, UK)	1:10 000

Die PVDF-Membran wurde zur Detektion von MRP 1 bzw. MRP 3 mit jeweils 400 µl Luminol und Peroxidlösung (*Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate*, Millipore GmbH; Schwalbach/ Ts) für 5 min überspült. Dabei katalysierte die Peroxidase des Meerrettichs die Oxidation von Luminol. Das enzymatisch produzierte Lichtsignal wurde im Lumineszenz Viewer (*LAS 3000 Intelligent Dark Box*, Fujifilm, Elektronik Imaging Europe GmbH; Düsseldorf) aufgenommen.

Nach der Detektion von MRP 1 bzw. MRP 3 wurde die Membran mit einem gegen die konstitutiv exprimierte GAPDH gerichteten Antikörper inkubiert, um so Schwankungen im Gesamtproteinauftrag feststellen und später herausrechnen zu können. Nach erfolgter Immunodetektion wurde die Membran in Methanol geschwenkt, getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt. Für die semiquantitative Auswertung der Proteinbanden wurde das Programm Multi-Gauge (*Version 3.0*, FUJIFILM Europe GmbH; Düsseldorf) verwendet.

Strippen der Membran

Um die Bindungen von Primär- und Sekundärantikörper auf der PVDF-Membran für eine erneute Immunodetektion zu lösen, wurde die Membran für 30 min bei 55 °C in 10 ml Stripping-Puffer auf dem Schüttelinkubator (*GFL-3031*, Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel) inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3mal 5 min in Verdünnungspuffer II gewaschen, bevor die Immunodetektion wie oben beschrieben durchgeführt wurde. Die Effektivität dieses Verfahrens wurde vor erneuter Immunodetektion durch erneute Inkubation der Membran in Chemiluminescent HRP Substrat und die sich anschließende Detektion im Lumineszenz Viewer beurteilt.

Optimierungsschritte

Um die Qualität der Detektion von MRP 1 und MRP 3 aus MCF-7-Zellen zu verbessern, wurden verschiedene Optimierungsschritte durchgeführt, die im Folgenden aufgelistet werden. Das Ergebnis der jeweiligen Veränderung wurde durch Beurteilung der nach erfolgter Immunodetektion erhaltenen Banden evaluiert.

1. Zur Bestimmung der optimalen Konzentration des gegen MRP 1 bzw. MRP 3 gerichteten Primär- und des gegen murines IgG gerichteten Sekundärantikörpers waren zwei Schritte notwendig. Zunächst wurde bei konstanter Sekundärantikörperkonzentration (1:1000 in Waschpuffer) in verschiedenen Primärantikörperkonzentrationen inkubiert (1:400; 1:200). Dabei sollte die Antikörperkonzentration gefunden werden, aus der ein starkes, aber noch nicht gesättigtes Lumineszenzsignal resultiert. Durch Veränderung der Konzentration des Sekundärantikörpers (1:1000, 1: 2000, 1: 3000, 1: 10000) wurde die Stärke der Proteinbanden sowie das Hintergrundsignal optimiert.
2. Zur Optimierung des Blockens unspezifischer Bindungen der Antikörper wurden folgende Substanzen (jeweils in Waschpuffer gelöst) getestet: 5 % Milchpulver

(Humana Milchung eG; Everswinkel), 5 % BSA (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe), 1fach Roti[®]-Block (Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe).

3. Um die Waschschrirte zu optimieren, wurden Waschlösungen, -vorgänge und -geräte modifiziert. Dazu wurde nach Inkubation des Sekundärantikörpers einmalig 10 min mit dem jeweiligen Verdünnungspuffer (1 % Milcpulverlösung, 1% BSA-Lösung bzw. 0,1 fach Roti[®]-Block) gewaschen und die sich anschließenden, mit Wascpuffer durchgeführten Waschschrirte 3 – 6 mal für jeweils 10 min durchgeführt, um eventuelle Interaktionen zwischen der Block-Substanz und dem Lumineszenzsubstrat zu reduzieren. Um den Einfluss des für die Immunodetektion verwendeten Gefäßes, sowie der eingesetzten Geräte zu evaluieren, wurde die Detektion in 50 ml – Falconröhrchen (*Cell star*, Greiner Bio-One GmbH; Solingen) auf dem Kipp-/Rollermischer (*Stuart SRT6D*, Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe) und in Gelfärbeschalen auf dem Schüttelinkubator (*GFL-3031*, Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel) sowie auf dem Taumelmischer durchgeführt. Durch den Zusatz von Detergentien zum Wascpuffer ist es möglich, unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Dazu wurde zu PBS, pH 7,4, das Detergenz Tween20 in den Konzentrationen 0,05 % und 0,1% zugesetzt. Zum Lösen unspezifischer Antikörperbindungen wurde außerdem der Einfluss des Detergenz Triton-X100 (Sigma-Aldrich GmbH; München) in den Konzentrationen 0,1 % und 1 % untersucht. Durch den Zusatz hochkonzentrierter Salze zum Wascpuffer können Peptidbindungen auf der Membran gespalten und somit unspezifische Hintergrundbindungen reduziert werden. Dazu wurde die Membran im Anschluss an die Waschschrirte nach der Inkubation des Sekundärantikörpers 3mal für jeweils 10 min in Hochsalzwascpuffer (0,5M NaCl und 0,2 % SDS in Wascpuffer) gewaschen, bevor das Lumineszenzsignal detektiert wurde.

4.8 Untersuchung des Einflusses von Hyperthermiebehandlung, Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 *in vitro*

Um den Einfluss von nichtlethaler Hyperthermiebehandlung auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 *in vitro* zu untersuchen, wurden BT-474-Zellen für jeweils 15, 30, 60, 90 bzw. 120 min bei 43 °C behandelt. Dabei sollte neben dem Einfluss der Hyperthermiedauer der Einfluss einer Postinkubationszeit von 0, 2, 24 und 48 h bei 37 °C untersucht werden, um den

Zeitpunkt eventueller Expressionsänderungen besser eingrenzen zu können. Die Durchführung erfolgte unter sterilen Bedingungen entsprechend des in Abbildung 4 dargestellten Schemas.

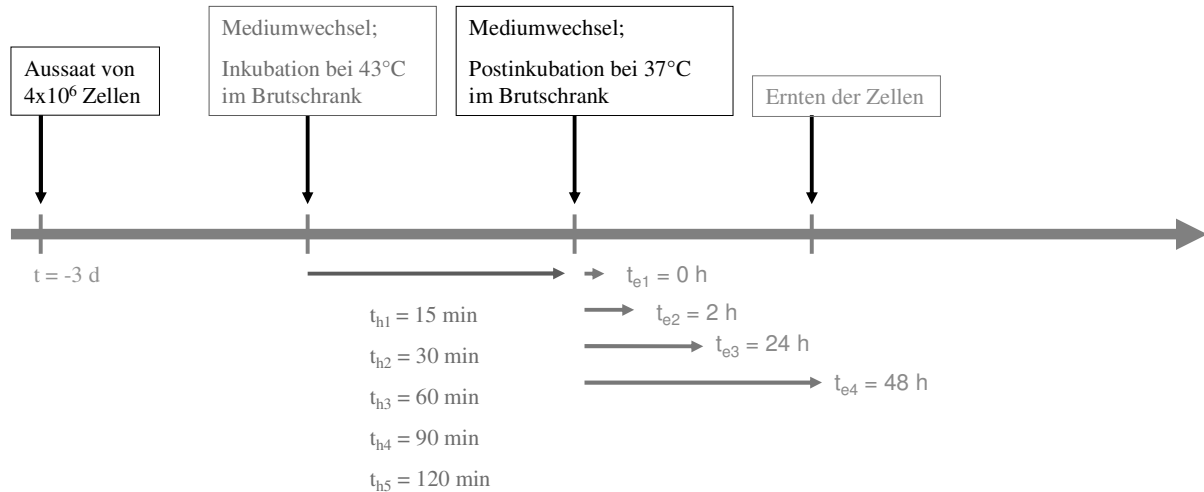


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Hyperthermiebehandlung von BT-474-Zellen bei 43°C über einen Zeitraum von 15, 30, 60, 90 bzw. 120 min ($t_{h1} \dots t_{h6}$) bei einer Postinkubationszeit von 0, 2, 24 bzw. 48 h ($t_{e1} \dots t_{e4}$) bei 37°C ; als Kontrolle wurden unbehandelte BT-474-Zellen über den gesamten Zeitraum bei 37°C mitgeführt

Jeweils 4×10^6 vitale BT-474-Zellen wurden in 6 Zellkulturflaschen (*Cell star*, Greiner Bio-One GmbH; Solingen) mit einer Wachstumsfläche von 175 cm^2 ausgesät. Nach einer Wachstumsdauer von 3 Tagen und erreichter 80-90 %iger Konfluenz wurden die Zellen für 15, 30, 60, 90 und 120 min bei 43°C im Brutschrank (5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit; *Heracell*, Fisher Scientific GmbH; Schwerte) hyperthermiebehandelt und im Anschluss 0, 2, 24 bzw. 48 h unter Standardkulturbedingungen bei 37°C im Brutschrank weiter inkubiert. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Hyperthermiebehandlung im gesamten Zeitraum unter Standardkulturbedingungen mitgeführt. Direkt nach Ende der jeweiligen Gesamtbehandlungszeit wurden die Zellen geerntet, um nach der sich anschließenden RNA- und Proteinisolierung die Expression von MRP 1 und MRP 3 zu untersuchen.

Weiterhin sollte der Einfluss des Chemotherapeutikums Mitomycin C (Applichem GmbH; Darmstadt) in An- und Abwesenheit von Hyperthermie (43°C) auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 *in vitro* in BT-474-Zellen untersucht werden.

Hierfür wurde zunächst die Stabilität von Mitomycin C in Medium untersucht, um auch bei erhöhten Temperaturen eine unveränderte Struktur und Wirksamkeit zu gewährleisten. Dazu wurde Mitomycin C in Zellkulturmedium in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Analog zu den Zellversuchen wurde 1ml der Lösung für 23 h bei 37°C und anschließend 60 min bei

43°C inkubiert, worauf sich wiederum eine Inkubation bei 37 °C (für 24 h) im Brutschrank anschloss. Die Stabilität von Mitomycin C wurde 0, 23, 24 und 48 h nach dem Lösen spektrophotometrisch (*Ultrospec 3300 pro*, GE Healthcare Europe GmbH; Freiburg) vermessen.

Um den Effekt einer 60 minütigen Hyperthermiebehandlung *nach* der Gabe des Chemotherapeutikums auf BT-474 Zellen zu untersuchen, wurden 6 Zellkulturflaschen mit jeweils 4×10^6 vitalen BT-474-Zellen pro 175 cm² Wachstumsfläche ausgesäht. Nach einer Wachstumszeit von 3 Tagen und Erreichen von 80-90 %iger Konfluenz wurde das Zellkulturmedium gewechselt und 0,15 bzw. 1,5 µg Mitomycin C pro cm² Wachstumsfläche zugegeben. Mitomycin C wurde bei der hyperthermiebehandelten Gruppe für 23 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert und im Anschluss für eine weitere Stunde bei 43°C im Brutschrank hyperthermiebehandelt, bevor ein Mediumwechsel erfolgte. Die hyperthermieunbehandelte Gruppe wurde für 24 h unter Standardkulturbedingungen mit Mitomycin C behandelt und anschließend das Medium gewechselt. Nach einer Erholungsphase von 24 h unter Standardkulturbedingungen wurden die Zellen geerntet und RNA bzw. Proteine für den Nachweis von MRP 1 und 3 isoliert.

Um den Einfluss von 90 min Hyperthermie bei 43°C *vor* der Gabe des Chemotherapeutikums auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 in BT-474-Zellen zu untersuchen, wurden jeweils 4×10^6 vitale BT-474-Zellen in 6 Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² ausgesäht. Nach 3 Tagen und Erreichen von 80-90 %iger Konfluenz wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die hyperthermiebehandelte Gruppe im Brutschrank bei 43°C für 90 min inkubiert, während die hyperthermieunbehandelte Gruppe unter Standardkulturbedingungen belassen wurde. Nach erneutem Wechsel des Zellkulturmediums wurden 0,15 bzw. 1,5 µg Mitomycin C pro cm² Wachstumsfläche zugefügt und für 24 h bei Standardkulturbedingungen inkubiert. Ohne eine weitere Erholungszeit wurden die Zellen geerntet. Nach der Isolation von RNA und Proteinen erfolgte ein Nachweis von MRP 1 und 3. Als Kontrollen wurden in der hyperthermiebehandelten und –unbehandelten Gruppe Mitomycin C – unbehandelte BT-474-Zellen mitgeführt.

Zur Untersuchung des Einflusses von magnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 in BT-474-Zellen wurden dextranumhüllte magnetische Nanopartikel (*fluidMAG-DX*, chemicell GmbH, Berlin) mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 50 nm verwendet, da für dextranumhüllte Nanopartikel eine gute Biokompatibilität bekannt ist (Shubayev et al. 2009) und später eine Kopplung von Mitomycin C an fluidMAG-DX erfolgen soll. Zur Homogenisierung der Partikel wurden

diese direkt vor der Verwendung 15 min im Ultraschallbad (*Sonorex Super RK52H*, Bandelin; Berlin) behandelt und anschließend für 1 min gevortext. Zur Prophylaxe einer eventuell durch die Partikel verursachten bakteriellen Besiedlung wurde zusätzlich eine Penicillin-Streptomycin-Lösung (1:100) (Biochrom AG; Berlin) zugefügt. Als Kontrollen wurden jeweils in der hyperthermiebehandelten und –unbehandelten Gruppe partikelunbehandelte BT-474-Zellen mitgeführt.

Um den Einfluss von 60 min Hyperthermie bei 43°C nach der Gabe von Eisenoxidnanopartikeln zu untersuchen, wurden jeweils 4×10^6 vitale BT-474-Zellen auf 8 Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² ausgesäht. Nach einer Wachstumszeit von 3 Tagen und Erreichen von 80-90 %iger Konfluenz wurde das Zellkulturmedium gewechselt und fluidMAG-DX in den Konzentrationen 1,5, 15 bzw. 150 µg Fe/ cm² Wachstumsfläche zugefügt. Nach einer Partikelinkubation von 23 h unter Standardkulturbedingungen wurden die Zellen der hyperthermiebehandelten Gruppe für 1 h bei 43°C im Brutschrank inkubiert, während die Zellen der hyperthermieunbehandelten Gruppe unter Standardkulturbedingungen weiterbehandelt wurden. Zur Entfernung von nicht aufgenommenen Partikeln wurden die Zellen 3mal mit jeweils 10 ml Zellkulturmedium gewaschen. Nach einer Erholungsphase von 24 h unter Standardkulturbedingungen wurden die Zellen für die RNA- und Proteinisolation und den sich daran anschließenden Nachweis von MRP 1 und MRP 3 geerntet.

Um den Einfluss von 90 min Hyperthermie bei 43°C nach der Gabe von Eisenoxidnanopartikeln zu untersuchen, wurden jeweils 4×10^6 vitale BT-474-Zellen auf 8 Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² ausgesäht. Nach einer Wachstumszeit von 3 Tagen und Erreichen von 80-90 %iger Konfluenz wurde das Zellkulturmedium gewechselt und fluidMAG-DX in den Konzentrationen 1,5, 15 bzw. 150 µg Fe/cm² Wachstumsfläche zugefügt. Nach 22,5 h wurden die Zellen 3mal mit jeweils 10 ml Zellkulturmedium gewaschen, um nicht aufgenommene Partikel zu entfernen. Die hyperthermiebehandelte Gruppe wurde nun 90 min bei 43°C inkubiert, während die hyperthermieunbehandelte Gruppe unter Standardkulturbedingungen weitergeführt wurde. Nach 90 min wurde das Zellkulturmedium erneut gewechselt und die Zellen nach einer Erholungsphase von 24 h unter Standardkulturbedingungen geerntet. Nach der anschließenden RNA- und Proteinisolation erfolgte ein Nachweis von MRP 1 und 3.

Ebenso wurde der Einfluss der Kombination von magnetischen Eisenoxidnanopartikeln, Mitomycin C und Hyperthermie bei 43 °C auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 *in vitro*

in BT-474-Zellen untersucht (siehe Abbildung 5). Dazu wurden jeweils 4×10^6 vitale BT-474-Zellen in 8 Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm^2 ausgesät. Nach 3 Tagen und Erreichen von 80 – 90 %iger Konfluenz wurde das Zellkulturmedium gewechselt und fluidMAG-DX in den Konzentrationen 1,5, 15 bzw. $150 \mu\text{g Fe/cm}^2$ Wachstumsfläche zugefügt. Nach 22,5 Stunden wurden die Zellen 3mal mit jeweils 10 ml Zellkulturmedium gewaschen, um nicht aufgenommene Partikel zu entfernen. Die hyperthermiebehandelte Gruppe wurde nun 90 min bei 43°C inkubiert, während die hyperthermieunbehandelte Gruppe unter Standardkulturbedingungen weitergeführt wurde. Nach 90 min wurde das Zellkulturmedium gewechselt und $1,5 \mu\text{g}$ Mitomycin C pro cm^2 Wachstumsfläche zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei Standardkulturbedingungen wurden die Zellen geerntet. Nach der Isolation von RNA und Proteinen erfolgte ein Nachweis von MRP 1 und 3. Als Kontrollen wurden in der hyperthermiebehandelten und –unbehandelten Gruppe Mitomycin C- und partikelunbehandelte BT-474-Zellen mitgeführt.

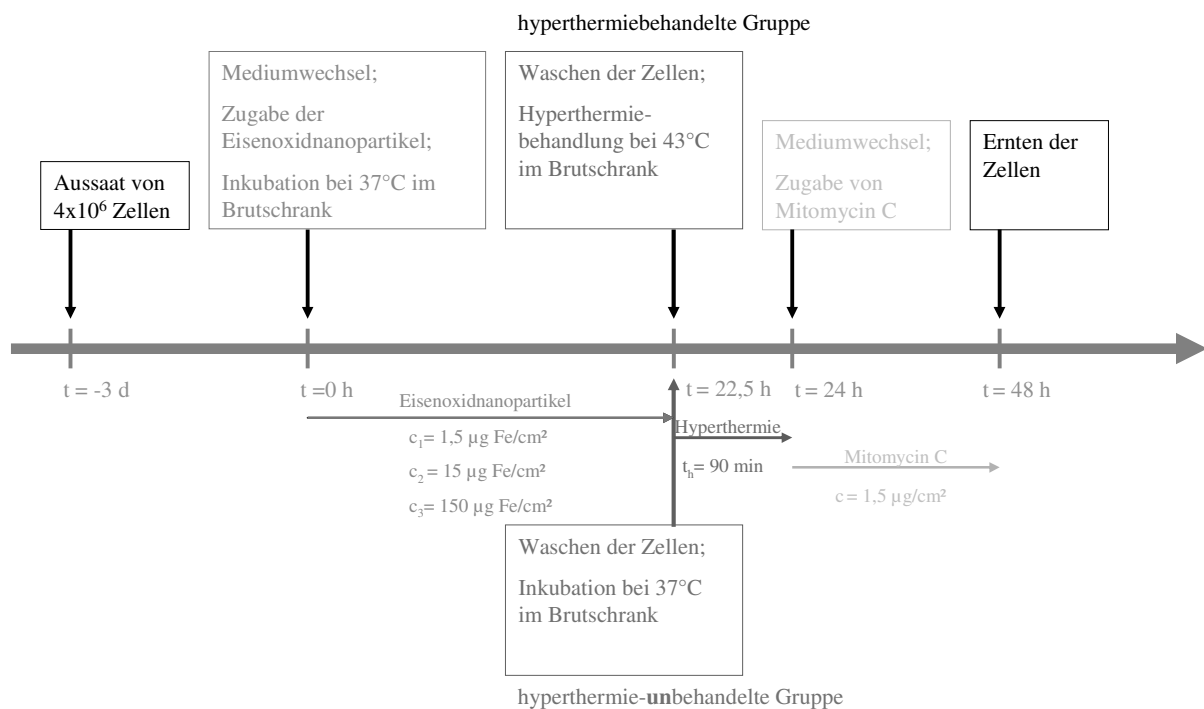


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kombinationsbehandlung von BT-474-Zellen mit magnetischen Eisenoxidnanopartikeln, Mitomycin C und Hyperthermie bei 43°C ; die Eisenoxidnanopartikel wurden in den Konzentrationen $1,5 \mu\text{g Fe/cm}^2$ und $15 \mu\text{g Fe/cm}^2$ und $150 \mu\text{g Fe/cm}^2$ über einen Zeitraum von 24 h in Kombination mit einer 90 minütigen Hyperthermiebehandlung bei 43°C inkubiert und dann für 24 h $1,5 \mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C zugefügt; oberhalb des Zeitstrahls ist die hyperthermiebehandelte Gruppe, unterhalb die hyperthermieunbehandelten Gruppe dargestellt; als Kontrolle wurden Partikel-unbehandelte Zellen über den gesamten Zeitraum für beide Gruppen mitgeführt

4.9 Untersuchung des Einflusses von Hyperthermiebehandlung, Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Vitalität von BT-474-Zellen

Um den Einfluss von magnetischen Eisenoxidnanopartikeln, Mitomycin C und Hyperthermie bei 43°C sowie deren Kombination auf die Vitalität von BT-474-Zellen zu untersuchen, wurde ein enzymatischer Vitalitätstest (MTS-Test, *CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, Promega, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei diesem Test wird das Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid-Formazan (MTS) durch zytosolische Dehydrogenasen in Anwesenheit von NADH und NADPH zu Formazan reduziert, was zu einem Farbumschlag von gelb zu violett, sowie zu einer bei 492 nm messbaren Absorption führt. Das Ausmaß des Farbumschlages bzw. der Absorption korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen und kann daher zur Beurteilung von Vitalität und Proliferation von Zellen in Kultur genutzt werden.

Je Well wurden 6000 BT-474-Zellen eingesetzt, da entsprechend der Wachstumskurve von BT-474-Zellen (Daten der Experimentellen Radiologie) für diese Zellzahl ein exponentielles Wachstum gewährleistet ist. Nach der Zellaussaat wurden die Zellen bei Standardkulturbedingungen über Nacht im Brutschrank (*Heracell*, Fisher Scientific GmbH; Schwerte) inkubiert, um ein Anheften der Zellen sicherzustellen. In Abbildung 6 ist die Versuchsdurchführung schematisch dargestellt.

Um den Einfluss der Eisenoxidnanopartikel fluidMAG-DX (chemicell GmbH; Berlin) auf die Vitalität von BT-474-Zellen zu untersuchen, wurden je Well 6000 BT-474-Zellen in drei 96-Well-Platten ausgesäht. Nach einer Nacht unter Standardkulturbedingungen wurden fluidMAG-DX in den Konzentrationen 1,5, 15 und 150 µg Fe/ cm² Wachstumsfläche zugefügt. In alle partikelunbehandelten Wells wurde frisches Zellkulturmedium pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 22,5 Stunden wurden die Zellen 3mal mit 100 µl Zellkulturmedium je Well gewaschen, um nicht aufgenommene Partikel zu entfernen und insgesamt 90 min weiter inkubiert: Entweder 90 min unter Standardkulturbedingungen, 90 min bei 43 °C oder 75 min unter Standardkulturbedingungen und 15 bei 43 °C. Nach insgesamt 90 min wurde in allen Ansätzen das Medium gewechselt und 0,15 bzw. 1,5 µg Mitomycin C pro cm² Wachstumsfläche zu den partikelunbehandelten Zellen und 1,5 µg Mitomycin C pro cm² Wachstumsfläche zu den partikelbehandelten Zellen zugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden unter Standardkulturbedingungen wurde der MTS-Test durchgeführt. Dazu wurden nach Entfernen des Zellkulturmediums 100 µl frisches Medium

und 20 µl MTS je Well zugefügt. Nach einer 4stündigen Inkubationszeit unter Standardkulturbedingungen im Brutschrank wurde die Intensität des Farbumschlages bei 492 nm am Mikroplatten-Reader (*Tecan Sunrise Basic*, Tecan Deutschland GmbH; Crailsheim) gemessen. Als Kontrollen wurden Mitomycin C – und partikelunbehandelte Zellen mitgeführt.

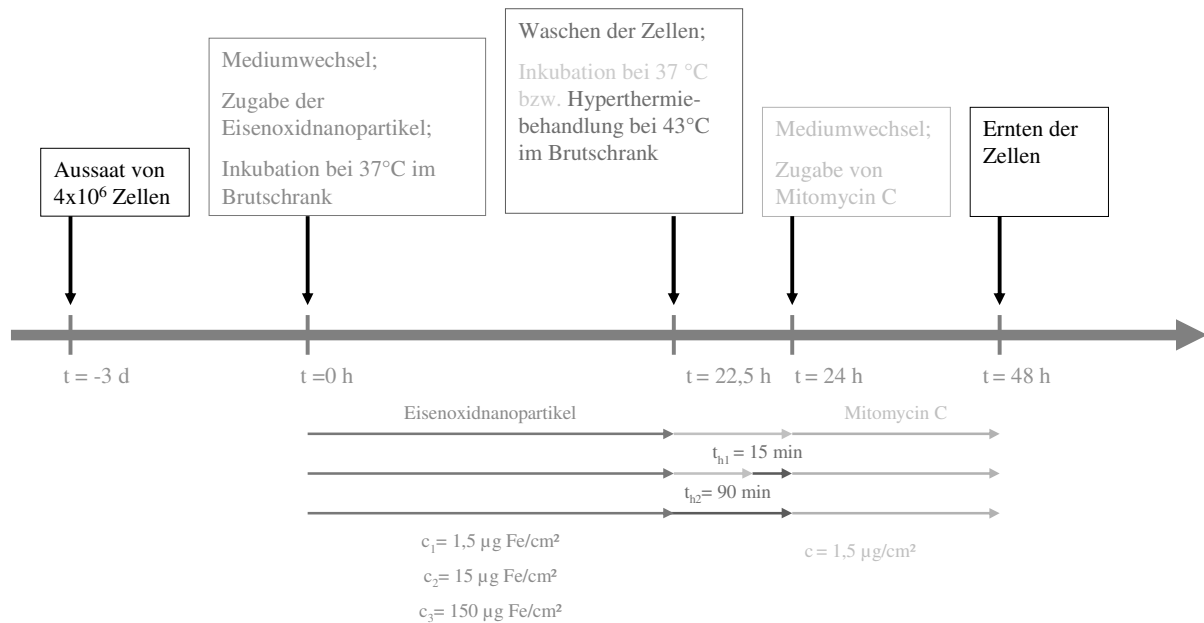


Abbildung 6: Schematische Darstellung des MTS-Test zur Untersuchung der Vitalität von BT-474-Zellen nach Behandlung mit magnetischen Eisenoxidnanopartikeln, Mitomycin C und Hyperthermie bei 43°C . Die Eisenoxidnanopartikel wurden in den Konzentrationen $1,5 \mu\text{g Fe/cm}^2$ und $15 \mu\text{g Fe/cm}^2$ und $150 \mu\text{g Fe/cm}^2$ über einen Zeitraum von 24 h in Kombination mit einer 15 bzw. 90 minütigen Hyperthermiebehandlung bei 43°C inkubiert und dann für 24 h $1,5 \mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C zugefügt. Als Kontrolle wurden hyperthermie-unbehandelte Zellen über den gesamten Zeitraum mitgeführt.

4.10 Statistische Auswertung

Die deskriptive statistische Auswertung der quantitativen und semiquantitativen Daten erfolgte mit dem Programm PASW Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Im Rahmen der Ermittlung einer reproduzierbaren Methodik zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurde der Spearman-Korrelationskoeffizient zwischen zwei Methoden gebildet und so untersucht, ob ein gerichteter Zusammenhang zwischen zwei Methoden besteht. Korrelationen $> 0,5$ wurden als guter Zusammenhang betrachtet und als Indikator genutzt, dass zwei Methoden in ihrer Richtung ähnliche Werte liefern können.

Alle Untersuchungen zum Einfluss von Hyperthermie, Mitomycin C und magnetischen Nanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und 3 auf RNA- und Proteinebene wurden zweifach durchgeführt. Durch Bildung des Spearman-Korrelationskoeffizienten wurde die Korrelation zwischen beiden Durchführungen ermittelt und so untersucht, ob sich beobachtete

Tendenzen im Wiederholungsversuch bestätigen konnten. Korrelationen $> 0,5$ wurden als guter Zusammenhang betrachtet. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden dreimal durchgeführt. Signifikanzen wurden über den Kruskal-Wallis-Test ermittelt, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable in ihrem Erwartungswert unterscheiden. Die Vitalitätsuntersuchungen erfolgten in drei unabhängigen Zellversuchen jeweils im Dreifachansatz. Die Beurteilung von Signifikanzen zwischen MCF-7- und BT-474-Zellen erfolgte hier mittels T-Test und zwischen MRP 1 und 3 mittels Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben. Als Signifikanzniveau wurde ein Niveau $< 0,05$ angenommen.

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis der Expression von MRP 1 und MRP 3 in den humanen Brustkrebszelllinien MCF-7 und BT-474 mittels Durchflusszytometrie

Der Nachweis der Expression der membranständigen Proteine MRP 1 und MRP 3 auf der Oberfläche von BT-474- und MCF-7-Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Messung erfolgte in drei unabhängigen Ansätzen, die durch Bildung von Mittelwert und Standardabweichung verrechnet wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten BT-474-Zellen ein signifikant höheres Signal für MRP 1 und MRP 3 im Vergleich zu den untersuchten MCF-7-Zellen lieferten ($p < 0,05$). Im Mittel waren $51,8 (\pm 5,9) \%$ der untersuchten BT-474-Zellen positiv für MRP 1 und $47,0 (\pm 10,4) \%$ positiv für MRP 3 (Abbildung 7). Ein für MRP 1 positives Signal wurde bei $22,4 (\pm 10,6) \%$ der untersuchten MCF-7-Zellen erhalten. $23,6 (\pm 1,1) \%$ der MCF-7-Zellen wurden für MRP 3 als positiv ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen MRP 1 und 3 innerhalb einer Zelllinie wurden nicht beobachtet.

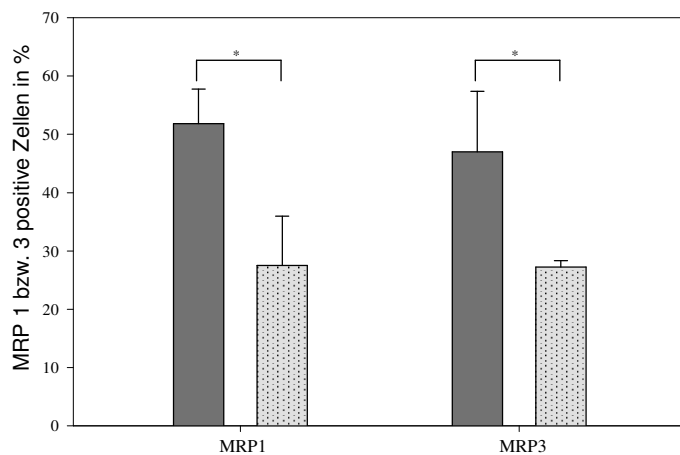


Abbildung 7: BT-474-Zellen (■) exprimieren signifikant mehr MRP 1 und MRP 3 im Vergleich zu MCF-7-Zellen (▨); angegeben ist der Anteil an Zellen, die nach der durchflusszytometrischen Messung für MRP 1 bzw. MRP 3 positiv definiert wurden; * $p < 0,05$

5.2 Optimierungen

Vor der Untersuchung des Einflusses von Hyperthermie, Mitomycin C und magnetischen Nanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und 3 war es notwendig, RNA- und Proteinisolation, sowie Proteinbestimmung, SDS-PAGE und Immunodetektion für den Nachweis von MRP 1 und MRP 3 zu optimieren. Dazu wurden die für MRP 1 und 3 als positiv beschriebenen MCF-7-Zellen verwendet.

5.2.1 Optimierung der RNA-Isolation aus MCF-7-Zellen

Bei der Isolation von RNA aus MCF-7-Zellen zum anschließenden Nachweis von MRP 1 bzw. MRP 3 waren mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche diagnostics GmbH; Mannheim) keine Verunreinigungen der RNA zu verzeichnen (siehe Tabelle 18). Bei der Durchführung der auf Trizol[®]-Reagent basierenden Isolationsmethode lagen die ermittelten Ratios deutlich außerhalb des Soll-Bereichs für Verunreinigungen mit Proteinen (Soll: 1,8 – 2,0) und Guanidin-Isothiocyanat (Soll > 2,0). Aufgrund der Ergebnislage wurde im Weiteren mit dem High Pure RNA Isolation Kit gearbeitet.

Tabelle 18: Geringere Verunreinigungen der RNA bei Isolation mit dem High Pure RNA-Isolation Kit im Vergleich zur Isolation mittels Trizol[®]-Reagent; dargestellt sind die Verhältnisse (Ratios) aus der Absorption von RNA bei 230, 260 bzw. 280 nm aus 6 unabhängigen mittels Trizol[®]-Reagent bzw. High Pure RNA Isolation Kit gewonnenen Ansätzen; grau hinterlegt sind die im Soll-Bereich (260/280-Soll: 1,8-2,2; 260/230-Soll: >2,0) liegenden Reinheitswerte

Isolationsmethode	Ratio	Ansatz	Ansatz	Ansatz	Ansatz	Ansatz	Ansatz
		1	2	3	4	5	6
Trizol [®] -Reagent	260/280	1,72	1,37	1,88	1,87	1,06	1,21
	260/230	1,70	1,35	1,55	1,63	1,18	1,25
High Pure RNA-Isolation-Kit	260/280	2,03	1,73	1,96	2,04	2,02	2,01
	260/230	2,15	1,77	2,05	2,17	2,15	2,15

5.2.2 Optimierung der Gesamt- und Membranproteinisolation aus MCF-7-Zellen

Für die Isolation von MRP 1 bzw. MRP 3 aus MCF-7-Zellen wurden verschiedene Methoden (Gesamtproteinisolation mittels RadioImmunoPräzipitationsAssay (RIPA) – Puffer, *ProteoJET[™] Membrane Protein Extraction Kit*, *Mem-PER[®] Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit*, Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation, eine detergentienbasierte Methode) der Gesamt- bzw. Membranproteinisolation, die sich sowohl in Art und Dauer der Isolation, als auch in den eingesetzten Puffersystemen unterschieden, getestet. Das Ergebnis wurde mittels SDS-PAGE und sich anschließender Immunodetektion überprüft. Die Ergebnislage führte zu einer Proteinisolation mittels detergentienbasierter Methode zum anschließenden Nachweis von MRP 1 und MRP 3.

5.2.2.1 Gesamtproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels RIPA-Lysepuffer

Eine Detektion von MRP 1 auf der erwarteten Höhe von 190 kDa (Abbildung 8, RP) war in mittels RIPA-Puffer isolierten Gesamtproteinen nicht möglich. In der Immunodetektion wurde ein Signal auf einer Höhe von etwa 60 – 75 kDa erhalten (Abbildung 8, Nr.1 – 7).

In Vorbereitung der SDS-PAGE wurden die Ansätze 5 min bei 95°C denaturiert. Um diese Denaturierung als Ursache der für MRP 1 zu klein detektierten Banden zu überprüfen, wurde dieser Schritt durch eine 15 minütige Inkubation bei 22 °C ersetzt. Es konnte dadurch eine Signalverstärkung der Banden auf Höhe von 60 – 75 kDa beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

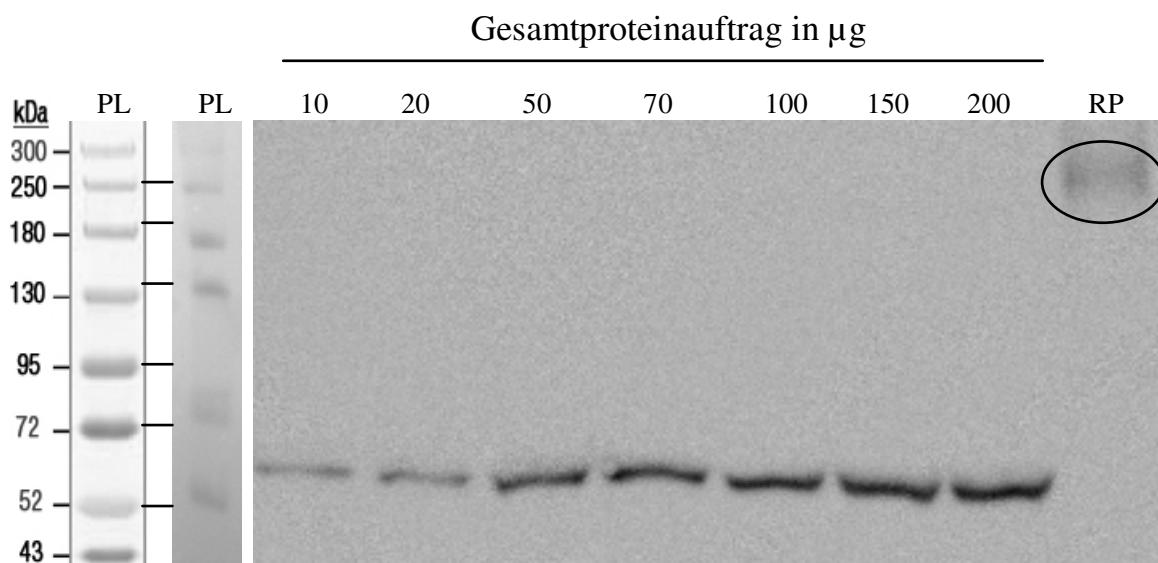


Abbildung 8: Immunodektion von MRP 1 in MCF-7-Zellen in mittels RIPA-Puffer isolierten Gesamtproteinen. Zum Nachweis von MRP 1 wurden 10, 20, 50, 70, 100, 150 und 200 µg Gesamtprotein in die SDS-PAGE eingesetzt; als Größenstandard wurden 10 µg gereinigtes MRP 1-Protein (RP) und eine Proteinleiter (PL, *High Range Protein Ladder*, Fermentas GmbH; Leon-Rot) mitgeführt

5.2.2.2 Membranproteinextraktion aus MCF-7-Zellen mittels ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit und Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit

Eine Detektion von MRP 1 auf Höhe von 190 kDa war mit den aus dem *ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit* (Fermentas GmbH; Leon-Rot) bzw. dem *Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit* (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) isolierten Proteinfractionen nicht möglich. Dagegen wurde, wie schon bei den mittels RIPA-Puffer isolierten Proteinen, eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa erhalten (Abbildung 9). Die Stärke des Signals war bei beiden Kits in der cytosolischen

(hydrophilen) Phase stärker als in der membranständigen (hydrophoben) Phase. In der cytosolischen Proteinfraktion aus zuvor eingefrorenen Zellpellets verringerte sich das Signal im Vergleich zur Fraktion aus direkt vor der Isolation gewonnenen Zellpellets. In der Membranproteinfraktion wurde nach der Verwendung von Proteinfraktionen aus eingefrorenen Zellpellets kein Signal erhalten.

Da keine Detektion von MRP 1 mit dem erwarteten Molekulargewicht von 190 kDa möglich war, wurde im Folgenden die Membranproteinisolation mittels Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation für die Isolation von MRP 1 getestet.

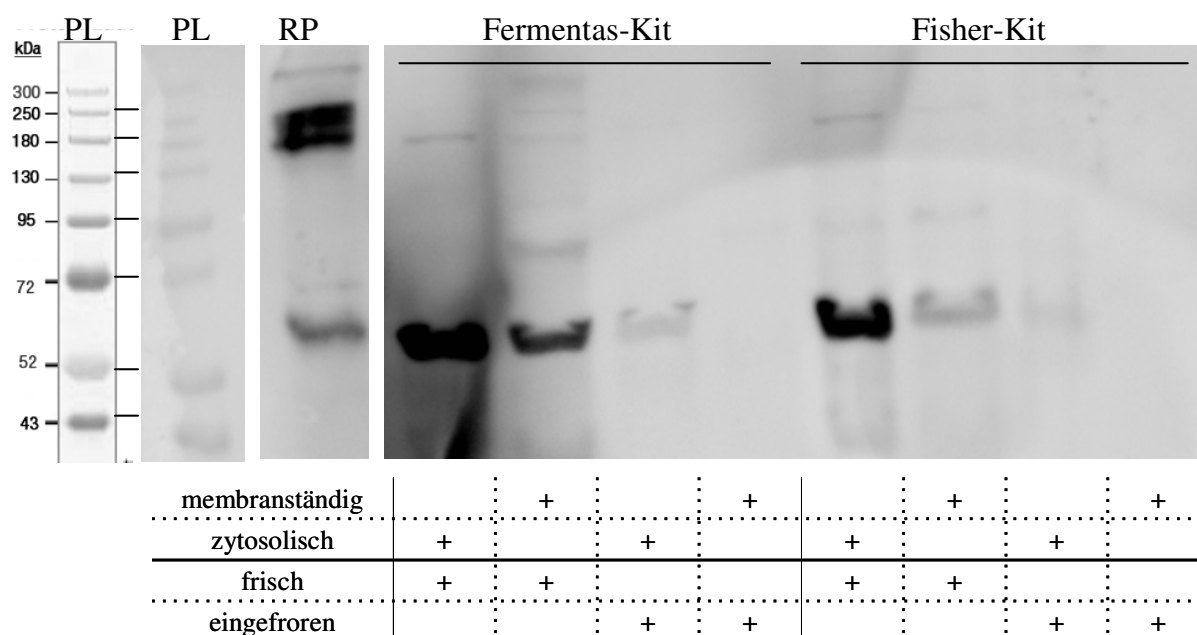


Abbildung 9: Immunodetektion von MRP 1 in MCF-7-Zellen in jeweils 50 µg mittels kommerziell erworbenen Membranproteinisolationskits gewonnenen Proteinfraktionen; verwendet wurden das ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit (Fermentas GmbH; Leon-Rot) und das Mem-PER® Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit (Fisher Scientific GmbH, Schwerte); aufgetragen sind die aus direkt vor der Proteinisolation gewonnenen (*frisch*) bzw. aus nach der Isolation bei -20°C gelagerten (*eingefroren*) Zellpellets erhaltene hydrophile (*zytosolisch*) und hydrophobe Phase (*membranständig*); als Größenstandard wurden 10 µg gereinigtes MRP 1 Protein (RP) und eine Proteinleiter (PL, *High Range Protein Ladder*, Fermentas GmbH; Leon-Rot) mitgeführt

5.2.2.3 Membranproteinextraktion mittels Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation

Mit der Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation konnte MRP 1 erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei war eine reproduzierbare Bestimmung des Proteingehalts dieser Isolate nicht möglich.

Bei der Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugationsmethode wurde auf der für MRP 1 erwarteten Höhe von 190 kDa in der Zellmembranproteinfraktion (oberste Phase) eine Bande

erhalten (Abbildung 10; Pfeil, *Oben*). In der mittleren Phase wurde ein schwaches Signal auf Höhe von 190 kDa erhalten (Abbildung 10; *Mitte*), während in der unteren Phase keine Detektion möglich war (Abbildung 10; *Unten*). Dieses Ergebnis konnte auch für isolierte Proteinfractionen aus zuvor eingefrorenen Zellpellets bestätigt werden (Abbildung 10).

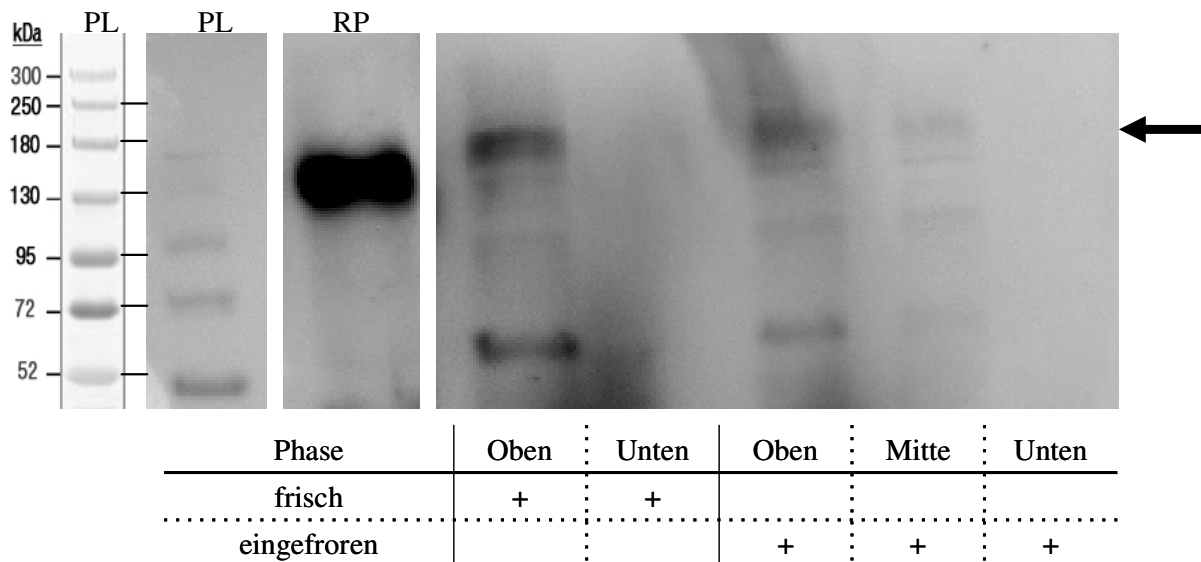


Abbildung 10: Erfolgreiche Immunodetektion von MRP 1 (Pfeil) in MCF-7-Zellen in jeweils 50 µg mittels Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation gewonnenen Proteinen; Verwendung von direkt vor der Proteinisolierung gewonnenen (*frisch*) bzw. bei -20°C gelagerten Zellpellets (*eingefroren*); Auftrag der nach der Gradientenzentrifugation erhaltenen oberen (*Oben*), mittleren (*Mitte*) und unteren Phase (*Unten*); als Größenstandard wurden 10 µg reines MRP 1-Protein (RP) und eine Proteinleiter (PL) (*High Range Protein Ladder*, Fermentas GmbH; Leon-Rot) mitgeführt

Um die Reproduzierbarkeit dieser Membranproteinisolationmethode zum Nachweis von MRP 1 zu überprüfen, wurde der Proteingehalt in 6 unabhängigen Proteinfractionen mittels NanoDrop ermittelt und jeweils 50 µg Membranprotein in die SDS-PAGE eingesetzt. In der sich anschließenden Immunodetektion von GAPDH wäre bei einer identischen Menge an eingesetztem Protein ein isointenses Signal zu erwarten, da es sich bei der GAPDH um ein konstitutiv exprimiertes Protein handelt. Es konnte kein gleich starkes Signal für GAPDH in den 6 Proteinfractionen erhalten werden (Abbildung 11). Auch nach Entfernen des Percolls in unabhängigen Proben wurde kein isointenses Signal für GAPDH erhalten (Daten nicht gezeigt).

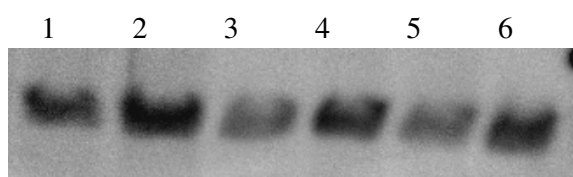


Abbildung 11: Immunodetektion von GAPDH in MCF-7-Zellen in jeweils 50 µg mittels Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation gewonnenen Proteinen (1-6)

5.2.2.4 Detergentienbasierte Membranproteinextraktion

In der Immunodetektion von MRP 1 aus Gesamtmembranproteinen, welche mittels einer detergentienbasierten Methode (Vellonen et al. 2010) isoliert wurden, wurde ein Signal auf der erwarteten Höhe von 190 kDa erhalten (Abbildung 12, Pfeil). Ein gut detektierbares, noch nicht gesättigtes Signal wurde für einen Gesamtproteinauftrag von 100 – 200 µg erhalten (Abbildung 12), sodass im Folgenden mit einer Einsatzmenge von 100 µg gearbeitet wurde.

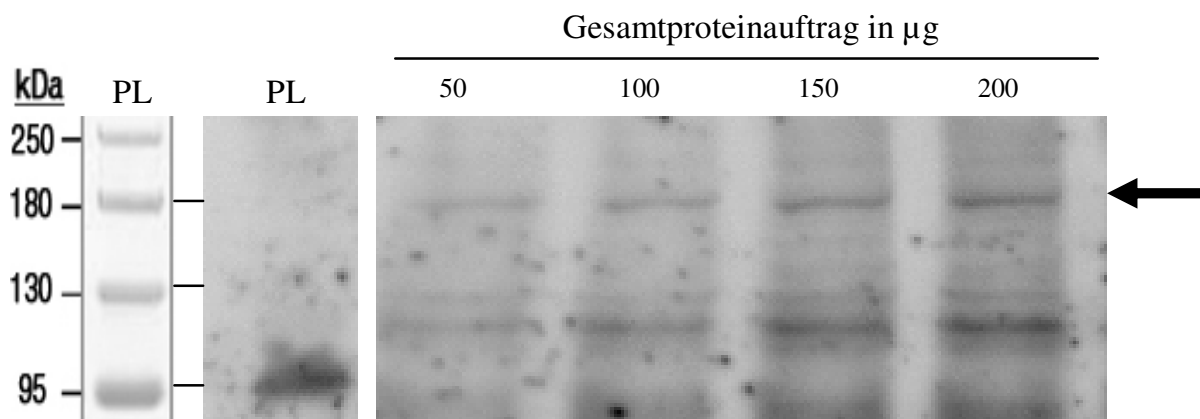


Abbildung 12: Erfolgreiche Immunodetektion von MRP 1 (Pfeil) in MCF-7-Zellen nach detergentienbasierter Proteinisolation; Auftrag von 50, 100, 150 und 200 µg Protein; als Größenstandards wurde eine Proteinleiter (PL) (*High Range Protein Ladder*, Fermentas GmbH; Leon-Rot) mitgeführt

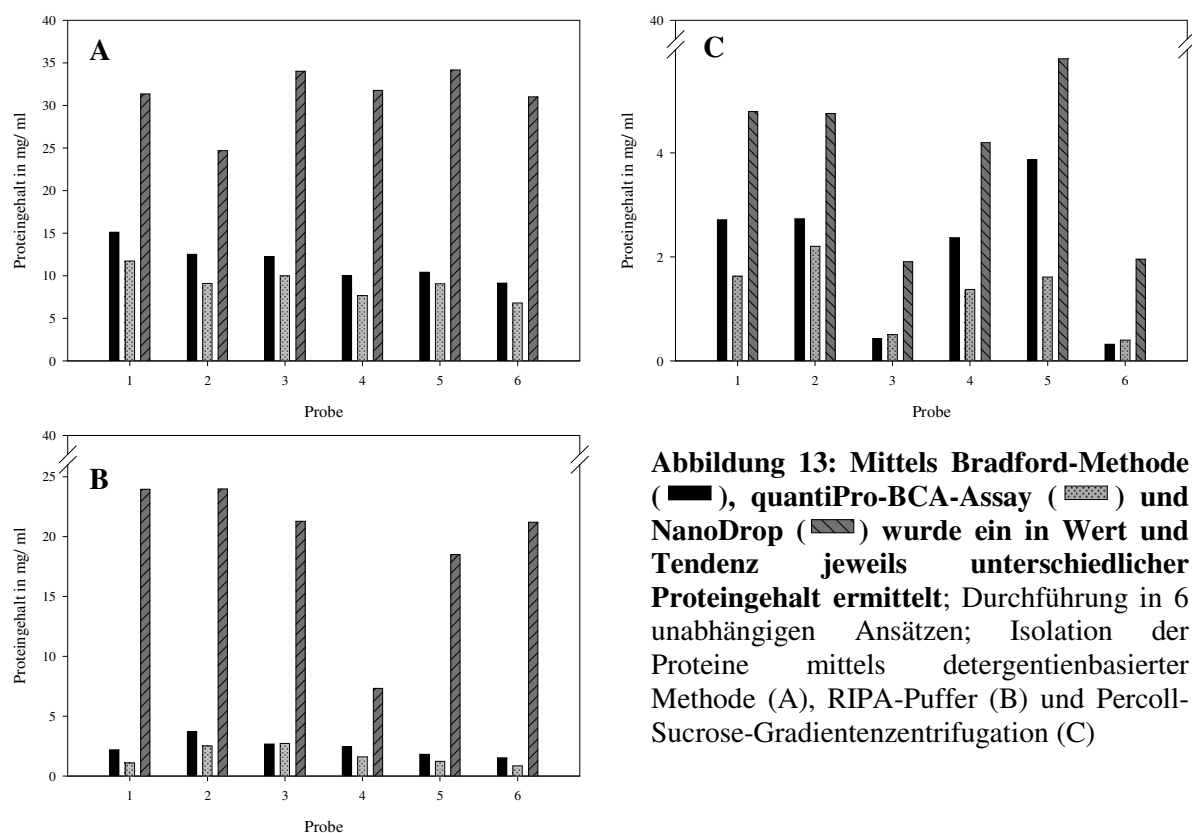
Da nur mit der detergentienbasierten Methode (Vellonen et al. 2010) ein reproduzierbarer Nachweis von MRP 1 auf einer Höhe von 190 kDa möglich war, wurde zur Membranproteinisolation im Rahmen der Untersuchung des Einflusses von Hyperthermie, Mitomycin C und magnetischen Nanopartikeln auf die Proteinexpression von MRP 1 und 3 die detergentienbasierte Membranproteinextraktion verwendet.

5.2.3 Vergleich der Gesamt- und Membranproteinbestimmung aus MCF-7-Zellen

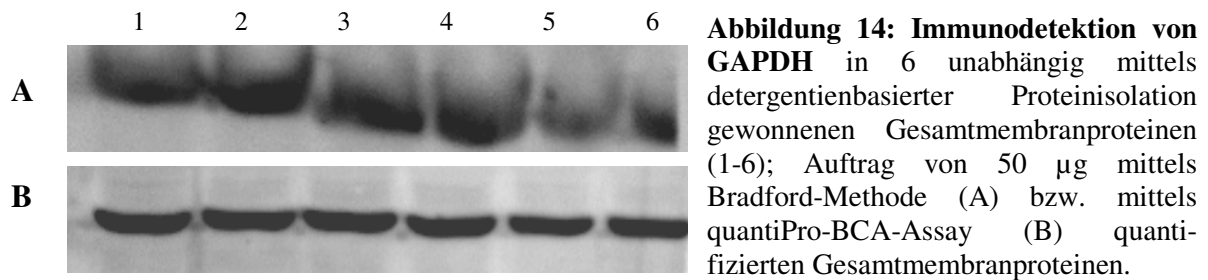
Die Ergebnislage zeigte, dass nur mit dem quantiPro-BCA-Assay eine reproduzierbare Proteinbestimmung, die einen einheitlichen Gesamtproteinauftrag aus mehreren unabhängigen Ansätzen gewährleistete, möglich war.

Für die detergentienbasiert isolierten Proteine lieferte die direkt photometrische Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop deutlich höhere Werte als die indirekt photometrischen Messungen mittels Bradford- bzw. quantiPro-BCA-Assay (siehe Abbildung

13 A). Unter Verwendung des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten konnte für die detergentienbasiert isolierten Proteine ermittelt werden, dass Bradford- und quantiPro-BCA-Methode in ihrer Tendenz ähnliche Konzentrationen liefern (Korrelation 94,3 %), während zwischen den aus der NanoDrop-Messung und aus dem Bradford- bzw. BCA-Assay hervorgegangenen Proteinkonzentrationen kein Zusammenhang festgestellt werden konnte (Korrelation -14,3 bzw. 8,6 %), weshalb zur weiteren Eingrenzung einer für einen reproduzierbaren Gesamtproteineinsatz in die SDS-PAGE geeigneten Proteinbestimmungsmethode die BCA- und die Bradford-Methode näher betrachtet wurden.



In einem Immunoblot zum Nachweis der konstitutiv exprimierten GAPDH in 6 unabhängigen Gesamtproteinisolaten, deren Konzentrationen mittels Bradford- bzw. BCA-Methode bestimmt wurden, konnte nur in mittels BCA-Methode vermessenen Gesamtproteinisolaten ein einheitlicher Nachweis von GAPDH erbracht werden. Für die Bradford-Methode war dies nicht möglich (siehe Abbildung 14).



Auch für die mittels RIPA-Puffer bzw. Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation isolierten Gesamtproteine konnten die für die detergentienbasierten Methode beschriebenen Beobachtungen bestätigt werden (Abbildung 13 B, C).

5.2.4 Optimierung der SDS-PAGE

Bei der Immunodetektion des reinen MRP 1- Proteins mit herkömmlichen Protokollen trat ein starkes Verschmieren der Banden auf (Abbildung 15 A), das durch verschiedene Änderungen behoben wurde (Abbildung 15 B). Dabei wurden der Effekt des jeweiligen Optimierungsschrittes mittels Immunodetektion von MRP 1 überprüft.

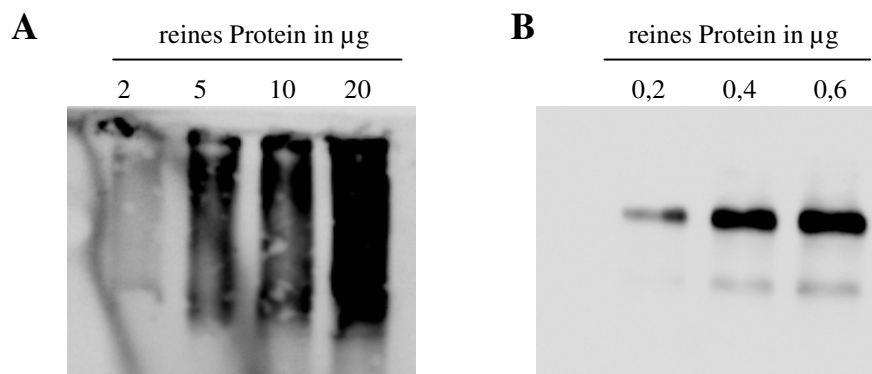


Abbildung 15: Erfolgreiche Variation der Versuchsparameter bei der Durchführung der SDS-PAGE, sodass ein starkes Verschmieren von reinem MRP 1 – Protein (A) behoben werden konnte (B); Einsatz von 2, 5, 10 und 20 (A), sowie 0,2, 0,4 und 0,6, µg (B) gereinigtes MRP 1 – Protein

Die Ergebnislage führte zu folgendem Protokoll: In die SDS-PAGE wurden 0,1 – 20 µg reines MRP 1 eingesetzt. Durch Einsatz von 0,1 – 1,0 µg reinem MRP 1 Protein bei Durchführung der SDS-PAGE mit einem 10 %igen Trenngel und einer Spannung von 120 V, sowie einer Konzentration des Sekundärantikörpers von 1:2500 konnten in der Immunodetektion gut auswertbare Banden detektiert werden (Abbildung 15 B).

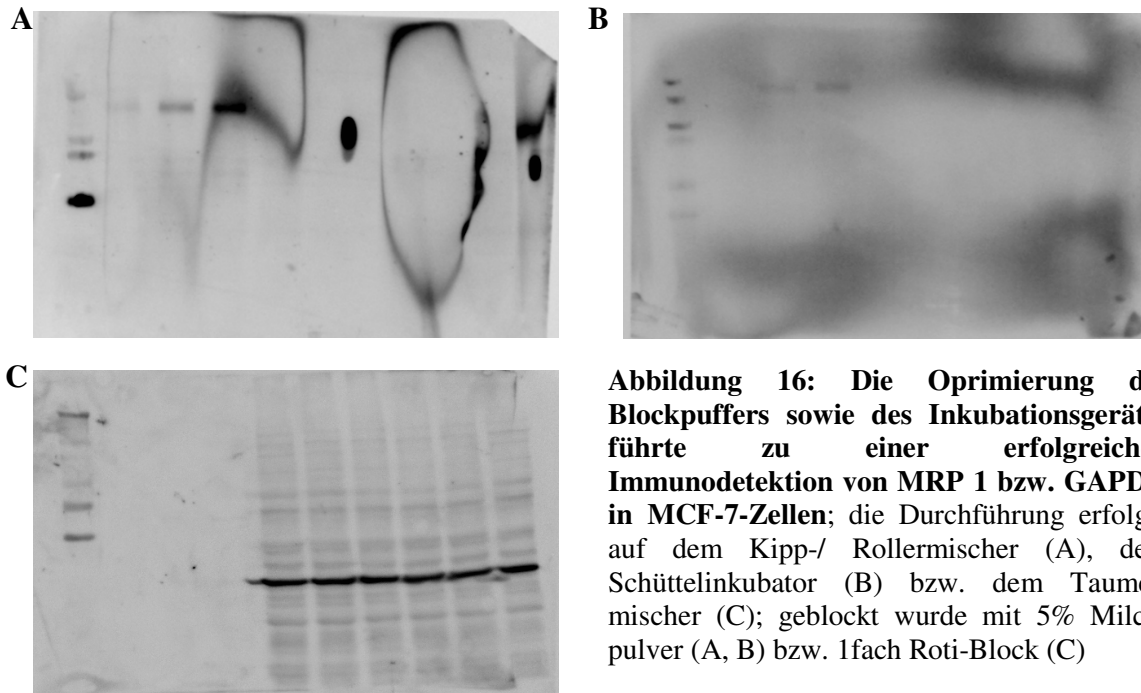
Die Durchführung in einem 8 %igen anstelle eines 10 %igen Trenngels zur Überprüfung, ob die Porengröße im Trenngel einen Einfluss auf die Wanderungsfähigkeit der reinen Proteine

hatte, erbrachte keine Änderung der Immunodetektion, weshalb im Weiteren mit einer Trennelkonzentration von 10 % gearbeitet wurde (Daten nicht gezeigt). Der Einsatz eines SDS-Probenpuffers ohne den Zusatz von β -Mercaptoethanol erbrachte keine Änderung der Signalqualität (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden wurde daher mit dem Zusatz von β -Mercaptoethanol weitergearbeitet. Auch eine äquivalente Inkubation der vorbereiteten Proteine für 15 min bei 22 °C anstelle eines 5minütigen Erhitzens bei 95 °C (Beschleunigung der Denaturierung und des Anlagerns von SDS) zur Überprüfung des Einflusses auf die Stabilität und Größe der Membranproteine MRP 1 und 3 beeinflusste das in der anschließenden Immunodetektion erhaltene Signal nicht (Daten nicht gezeigt). Die Durchführung der SDS-PAGE bei einer niedrigeren Spannung (60 bzw. 80 V anstelle von 120 V) um eine zu rasche Trennung der Proteine und damit ein mögliches Zerreißen der Proteine während der SDS-PAGE auszuschließen, änderte die Signalqualität in der Immunodetektion von MRP 1 nicht (Daten nicht gezeigt), weshalb die Gelelektrophorese im Weiteren standardmäßig bei 120 V durchgeführt wurde. Im Folgenden wurden in die SDS-PAGE 0,1 – 20 μ g reines MRP 1 eingesetzt und die für ein noch nicht gesättigtes Signal optimale Sekundärantikörper-Konzentration im Bereich von 1:1000 bis 1:10 000 ermittelt. Durch Einsatz von 0,1 – 1,0 μ g reinem MRP 1 Protein bei Durchführung der SDS-PAGE mit einem 10 %igen Trenngel und einer Spannung von 120 V, sowie einer Konzentration des Sekundärantikörpers von 1:2500 in der Immunodetektion konnten gut auswertbare Banden detektiert werden (Abbildung 15 B).

5.2.5 Optimierung des spezifischen Nachweises von MRP 1 und MRP 3 in MCF-7-Zellen mittels Immunoblotting

Bei der Immunodetektion von MRP 1 bzw. 3 nach herkömmlichen Protokollen (Durchführung des Western Blots im Semi-Dry Verfahren für 90 min bei 114 mA, Durchführung der Immunodetektion unter Verwendung einer Milchpulverlösung als Blocking- und Waschagenz auf dem Kipp-/ Rollermischer im Falconröhrchen und einer Verdünnung des Sekundärantikörpers von 1:1000) zeigte sich eine nicht verwertbare Darstellung der gewünschten Proteine. Dies äußerte sich u.a. durch große Flecken, die sich über die gesamten Membranen zogen (siehe am Beispiel in Abbildung 16 A, B). Nach zufrieden stellender Optimierung mit folgenden Parametern wurde eine gute Darstellung von MRP 1 und 3, sowie GAPDH erhalten (siehe am Beispiel in Abbildung 16 C): Blotdauer 100 min bei 130 mA, Blockdauer 1 h bei 22°C in gefilterter 1fach Rotiblocklösung auf dem

Taumelmischer, Waschdauer von 5 x 5 min mit gefilterter 0,1fach Rotiblocklösung, Verdünnung des Anti-MRP 1-Antikörpers (*clone QCRL-1*, Sigma-Aldrich GmbH; München) von 1:2000, des Anti-MRP 3-Antikörpers (*M3II-21*, Abcam; Cambridge, UK) von 1:200 mit einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:2500 und des Anti-GAPDH-Antikörpers (*sc-25778*, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Heidelberg) von 1:1000 mit einer Sekundärantikörperkonzentration von 1:10000.



Zur Optimierung wurde die Durchführung des Western Blots mit einer Stromstärke von 114 bis 130 mA und einer Dauer zwischen 90 und 120 min variiert, was die Effektivität des Proteintransfers, nicht aber die Ausgangsproblematik beeinflusste (Daten nicht gezeigt). Nach verschiedenen Optimierungsschritten, wie z.B. Austausch von Milchpulver als Basis der Blocklösung gegen BSA auf dem Schüttelinkubator, konnte eine Veränderung der Fleckenform dargestellt werden (siehe am Beispiel in Abbildung 16 B). Da danach die Ursache im Blocken und/ oder Waschen der Membran vermutet wurde, wurden weitere Geräte, Blocklösungen, sowie die Dauer des Blockens zwischen 1 und 2 h bei 22°C variiert (siehe Tabelle 20 im Anhang). Ferner wurde der Anteil der Detergentien Tween20 (0,05 – 0,1 %) und TritonX-100 (0,1 – 1 %) im Waschpuffer, sowie eine Waschfrequenz von 3- 6 x 5-10 min evaluiert (Daten nicht gezeigt). Eine Übersicht der verschiedenen Optimierungsschritte und deren Resultat ist in Tabelle 20 im Anhang dargestellt.

5.3 Einfluss Hyperthermie auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Behandlung von BT-474-Zellen bei 43 °C über einen Zeitraum von 15 bis 120 min gezeigt werden, dass es bei unbeeinflusster RNA-Expression insbesondere ab einer Behandlungsdauer von 90 min zu einer Abnahme von MRP 1 und MRP 3 auf Proteinebene kommt. Dagegen trat nach einer kurzen Behandlungsdauer von 15 und 30 min eine Steigerung, insbesondere von MRP 1, auf.

Die semiquantitativen Auswertungen erfolgten durch Normierung auf GAPDH.

Auf mRNA-Ebene konnten nach 15 bis 120minütiger Hyperthermiebehandlung im gesamten Postinkubationszeitraum (0 bis 48 h) für BT-474-Zellen keine Änderungen von MRP 1 und MRP 3 festgestellt werden (siehe Abbildung 17 am Beispiel einer Postinkubationszeit von 48 h und Abbildung 18).

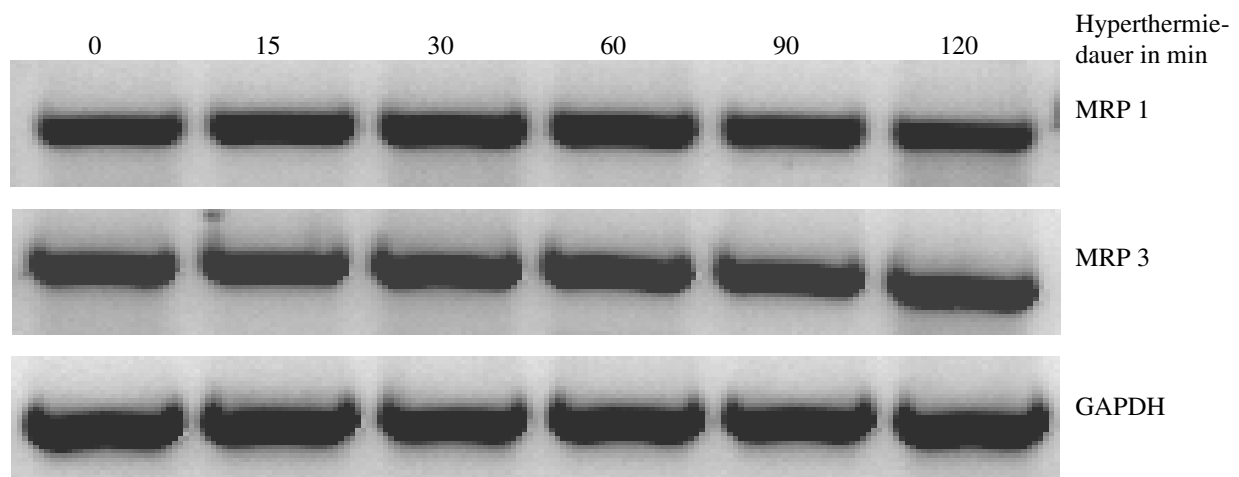


Abbildung 17: Repräsentatives Beispiel einer konstanten Expression von MRP 1- bzw. MRP 3 auf RNA-Ebene in BT-474-Zellen 48 h nach Hyperthermiebehandlung (43°C) über einen Zeitraum von 15, 30, 60, 90 und 120 min; als Kontrolle dienten wärmeunbehandelte BT-474-Zellen (0 min); als Ladekontrolle wurde GAPDH mitgeführt

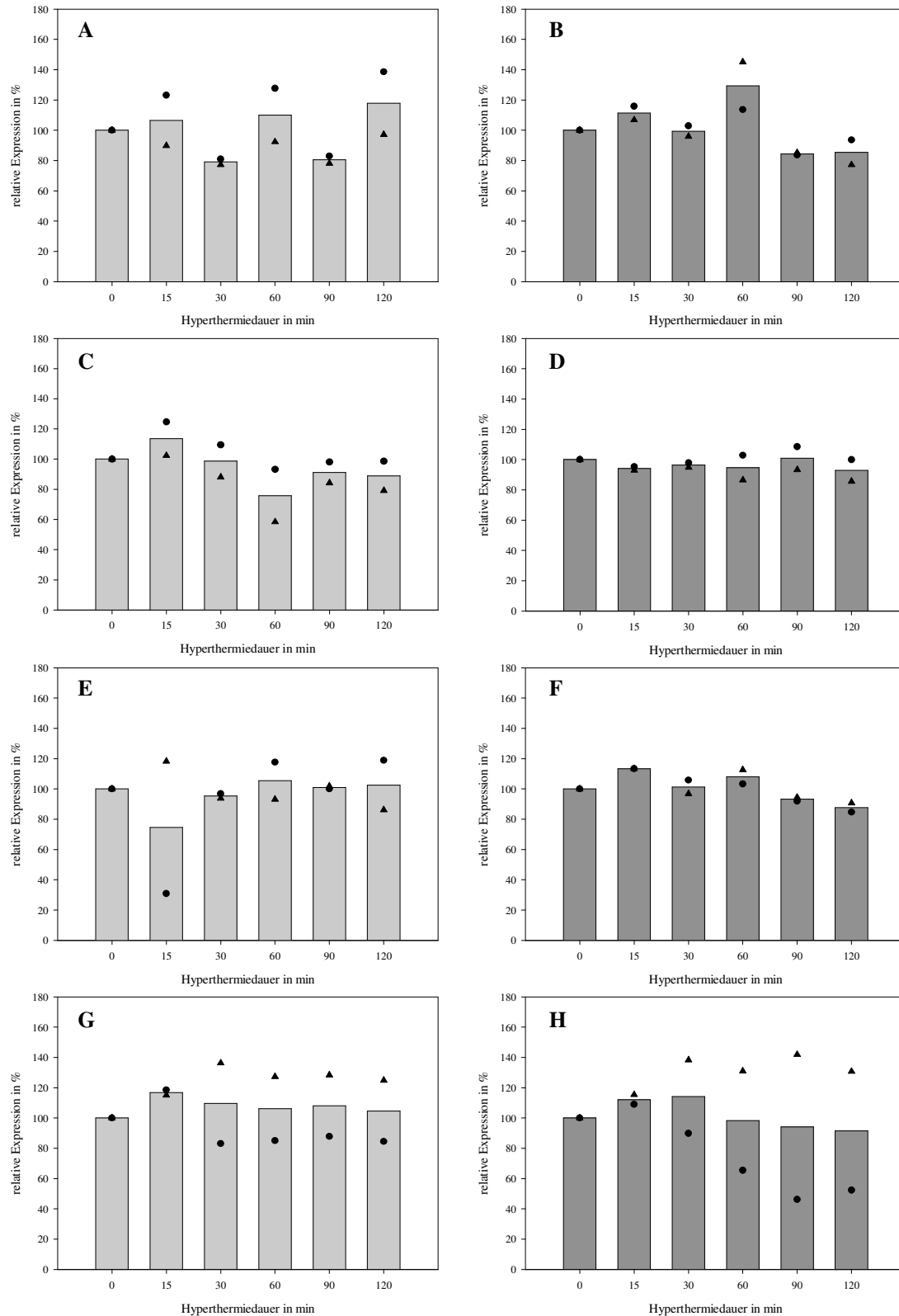


Abbildung 18: Auf RNA-Ebene zeigte sich keine deutliche Expressionänderung von MRP 1 (□) und MRP 3 (■) in BT-474-Zellen 0 (A, B), 2 (C, D), 24 (E, F) und 48 h (G, H) nach Behandlung mit Hyperthermie bei 43°C im Brutschrank über einen Zeitraum von 15, 30, 60, 90 bzw. 120 min; als Kontrolle wurden BT-474-Zellen unter Standardbedingungen mitgeführt (0 min); dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (▲ Durchgang 1; ● Durchgang 2), sowie die mittlere Expression (Balken); Ergebnisse normiert auf GAPDH

Repräsentativ für die Expressionsänderungen auf Proteinebene ist in Abbildung 19 ein Immunoblot dargestellt, auf dem bei isointensem GAPDH-Signal eine deutliche Abnahme von MRP 1 und 3 bei einer Hyperthermiedauer von 90 und 120 min zu sehen ist. Durch die Bildung des Spearman-Korrelationskoeffizienten konnte gezeigt werden, dass sich die im ersten Durchgang auf RNA- und Proteinebene gefundenen Tendenzen in Durchgang 2 bestätigen ließen.

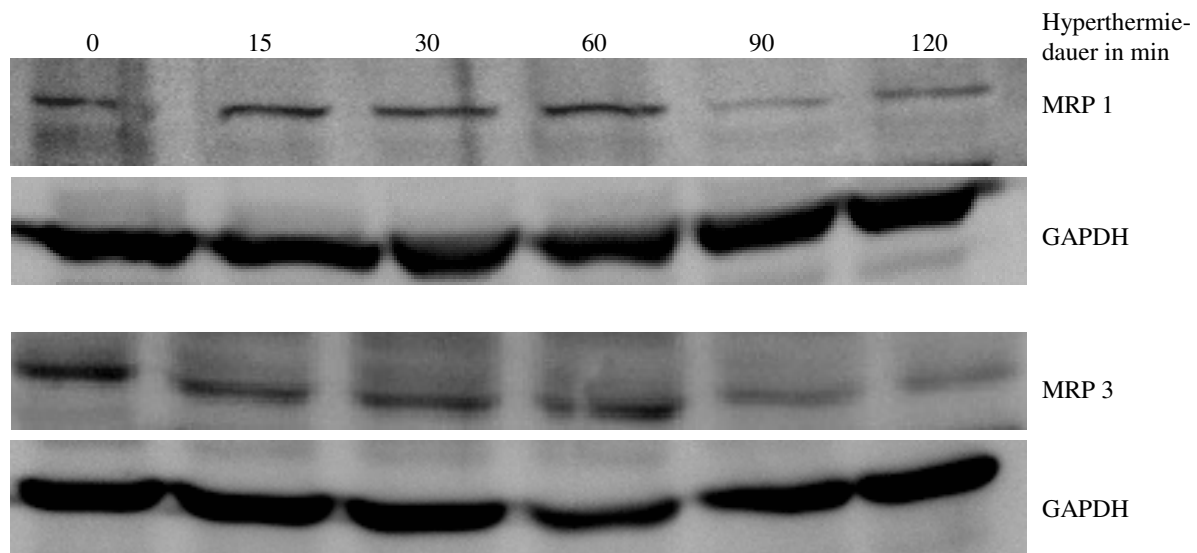


Abbildung 19: Repräsentatives Ergebnis einer Immunodetektion von MRP 1, MRP 3 und GAPDH in BT-474-Zellen 48 h nach Hyperthermiebehandlung bei 43°C über einen Zeitraum von 15, 30, 60, 90 und 120 min mit einer deutliche Abnahme von MRP 1 und MRP 3 auf Proteinebene nach Hyperthermiebehandlung für 90 und 120 min; wärmeunbehandelte Kontrolle (0 min); als Ladekontrolle wurde GAPDH mitgeführt

Bei der Darstellung von MRP 1 auf Proteinebene zeigte sich direkt nach der Hyperthermiebehandlung (0 h Postinkubation) bis zu einer Behandlungsdauer von 30 min eine mit steigender Behandlungsdauer zunehmende Erhöhung von MRP 1 auf im Mittel 146 %, die bei den Postinkubationszeiten 2, 24 und 48 h auf Kontrollniveau zurückging. Bei einer Behandlungsdauer von 60 min und 0 h Postinkubationszeit konnte keine Expressionsänderung von MRP 1 auf Proteinebene beobachtet werden. Bei einer Erhöhung der Postinkubationszeit auf 2 bzw. 24 h bei einer Behandlungsdauer von 60 min konnte eine Abnahme der mittleren Expression von MRP 1 auf bis zu 50 % des Kontrollniveaus beobachtet werden, bevor die Expression nach 48 h wieder auf Kontrollniveau anstieg. Dagegen kam es nach einer Hyperthermiebehandlung von 90 und 120 min zu allen Postinkubationszeiten (0, 2, 24 und 48 h) zu einer deutlichen Abnahme von MRP 1 auf unter 50 %, die bereits direkt nach der Behandlung bestand und über einen Postinkubationszeitraum von 0 – 48 h keine deutliche Änderung zeigte (Abbildung 20). Für MRP 3 zeigten sich auf Proteinebene ähnliche, etwas schwächere Effekte: Nach einer Hyperthermiebehandlung von 15 bzw. 30 min Dauer konnte

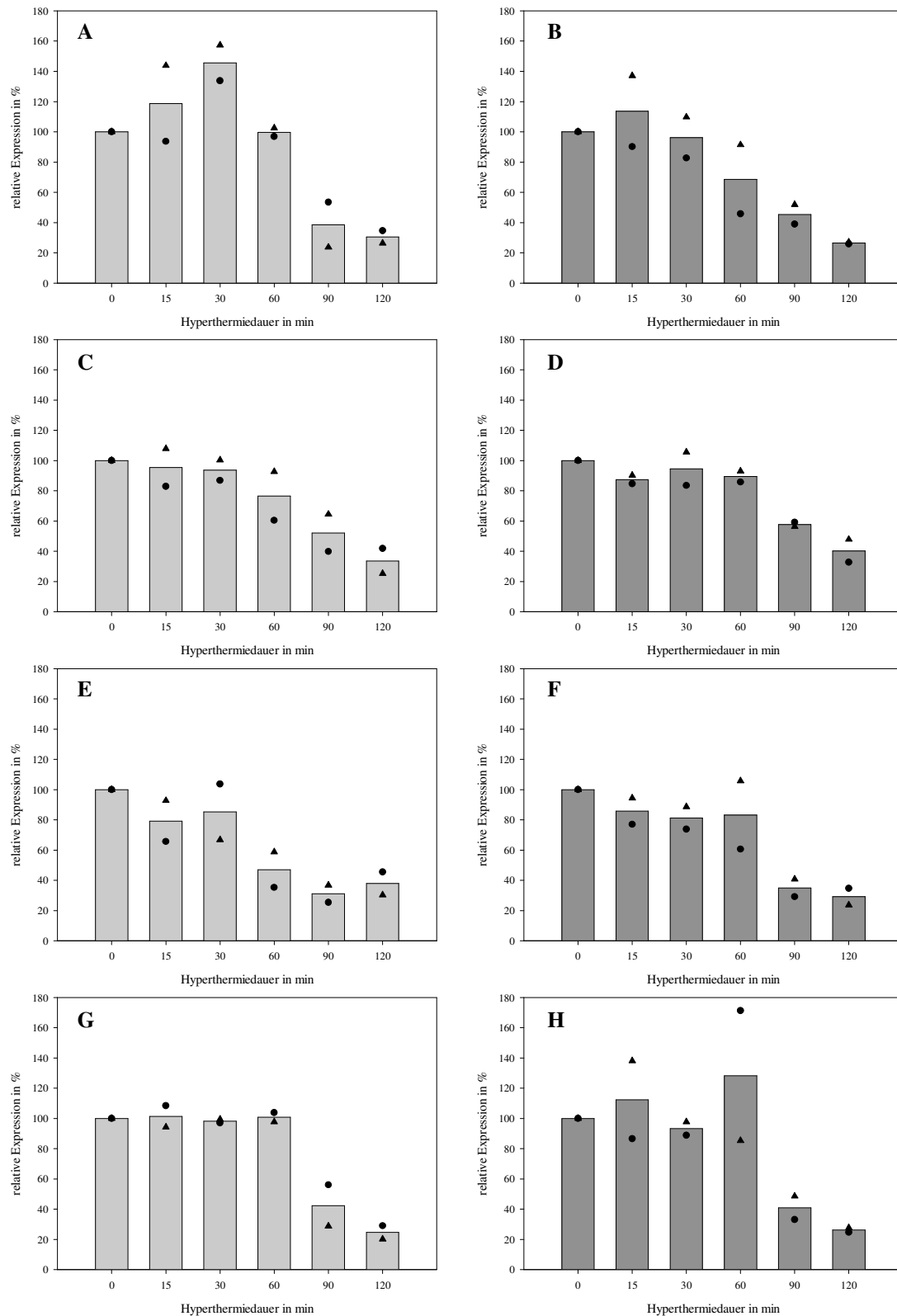


Abbildung 20: Deutliche Abnahme von MRP 1 (■) und MRP 3 (■) in BT-474-Zellen auf Proteinebene 0 (A, B), 2 (C, D), 24 (E, F) und 48 h (G, H) nach Behandlung mit Hyperthermie bei 43 °C über einen Zeitraum von 90 bzw. 120 min; als Kontrolle wurden BT-474-Zellen unter Standardbedingungen mitgeführt (0 min); während 0 h nach 15 bzw. 30 min Hyperthermie eine Steigerung von MRP 1 (A) beobachtet wurde, wurde zu allen weiteren untersuchten Zeiten keine Änderung von MRP 1 bzw. 3 ermittelt; dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (▲ Durchgang 1; ● Durchgang 2), sowie die mittlere Expression (Balken); Ergebnisse normiert auf GAPDH

für MRP 3 in der untersuchten Stichprobe zu keiner der gewählten Postinkubationszeiten eine Expressionsänderung festgestellt werden. Direkt nach einer 60minütigen Hyperthermiebehandlung (0 h Postinkubation) wurde eine Abnahme von MRP 3 auf im Mittel 69 % beobachtet, während 2, 24 und 48 h nach der Behandlung keine Expressionsänderung festgestellt werden konnte. Die für MRP 1 beobachtete Abnahme auf Proteinebene nach einer 90 und 120 minütigen Hyperthermiebehandlung konnte auch für MRP 3 bestätigt werden. Direkt nach 90 bzw. 120 minütiger Behandlung wurde eine Abnahme von MRP 3 auf im Mittel 45 bzw. 26 % beobachtet, die über den gesamten Postinkubationszeitraum von 48 h bestehen blieb (Abbildung 20).

5.4 Einfluss von Mitomycin C allein und in Kombination mit Hyperthermie auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit konnte eine mit zunehmender Mitomycin C – Konzentration zunehmende Abnahme von MRP 1 auf Proteinebene, der eine Abnahme auf RNA-Ebene voraus ging, gezeigt werden. Für MRP 3 wurde eine deutlich schwächere Abnahme beobachtet. Unter hyperthermen Bedingungen (60 und 90 min) wurde die Abnahme von MRP 1 und 3 verstärkt.

Die semiquantitativen Auswertungen erfolgten durch Normierung auf GAPDH. Für die Versuchsdurchgänge konnte jeweils eine gute Korrelation gezeigt werden, weshalb in der Darstellung der Mittelwert aus beiden Durchgängen gebildet wurde.

Auf RNA-Ebene konnte nach 24stündiger Behandlung von BT-474-Zellen mit $0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C 0 h (Abbildung 21) bzw. 24 h (Abbildung 22) Postinkubationszeit keine deutliche Expressionsänderung von MRP 1 in An- und Abwesenheit von Hyperthermie beobachtet werden.

Nach Behandlung mit $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C wurde eine Abnahme von MRP 1 – mRNA auf im Mittel 39 % nach einer Postinkubationszeit von 0 h (Abbildung 21) und 60 % nach 24 h beobachtet (Abbildung 22). Durch die Kombination mit Hyperthermie vor bzw. nach der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum wurde der beobachtete Effekt kaum beeinflusst (siehe auch Abbildung 23 A am Beispiel einer Postinkubationszeit von 24 h).

Die Expression von MRP 3 änderte sich auf RNA-Ebene durch die Behandlung mit Mitomycin C und unter dem zusätzlichen Einfluss von Hyperthermie im untersuchten

Zeitfenster kaum (Abbildung 21 B, Abbildung 22 B und Abbildung 23 B am Beispiel einer Postinkubationszeit von 24 h)

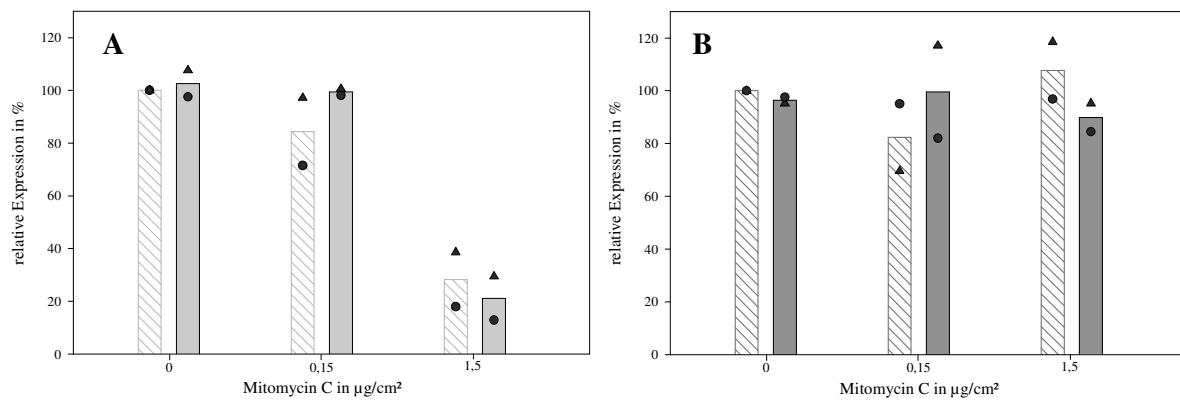


Abbildung 21: Expression von MRP 1 (A) bzw. MRP 3 (B) auf RNA-Ebene 0 h nach Behandlung mit 0,15 bzw. 1,5 µg/cm² Mitomycin C, die in Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermie (43°C) vor der Mitomycin C – Behandlung nicht beeinflusst wird; dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (▲ Durchgang 1; ● Durchgang 2) und die auf GAPDH normierten Mittelwerte mit (■, ■) und ohne (▨, ▨) Hyperthermie

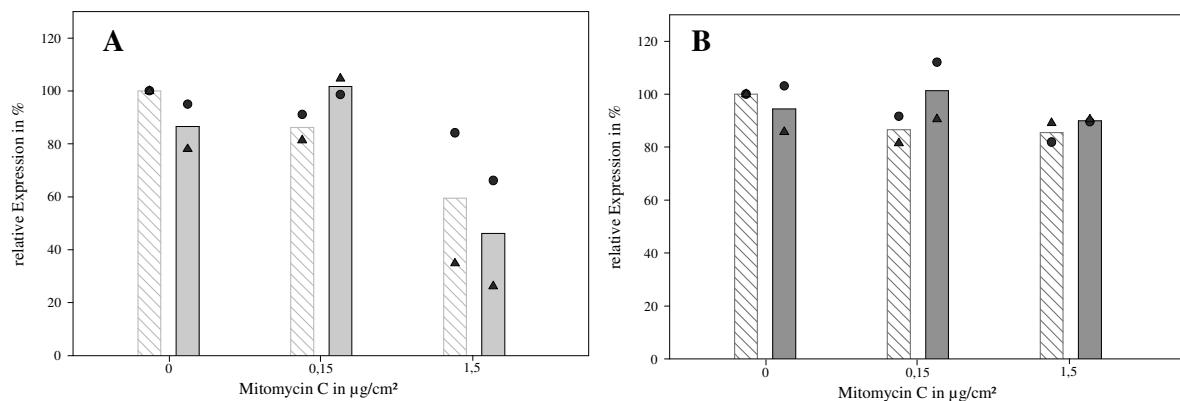


Abbildung 22: Expression von MRP 1 (A) und MRP 3 (B) auf RNA-Ebene 24 h nach Behandlung mit 0,15 bzw. 1,5 µg/cm² Mitomycin C, die in Kombination mit einer 60minütigen Hyperthermie (43°C) nach der Mitomycin C – Behandlung nicht beeinflusst wird; dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (▲ Durchgang 1; ● Durchgang 2) und die auf GAPDH normierten Mittelwerte mit (■, ■) und ohne (▨, ▨) Hyperthermie

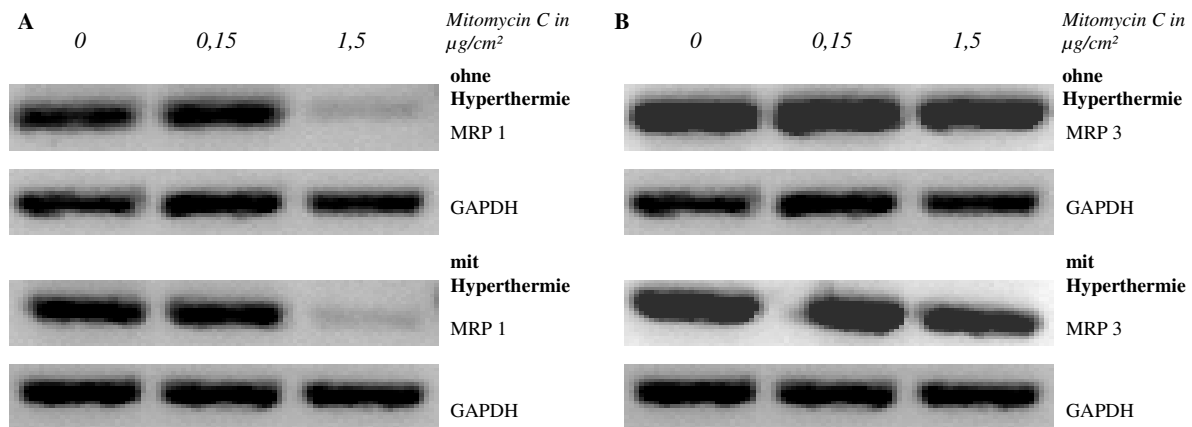


Abbildung 23: Repräsentatives Beispiel für die Abnahme der Expression von MRP 1 (A) auf RNA-Ebene nach Behandlung mit 0,15 bzw. 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C bei konstanter Expression von MRP 3 (B) in BT-474 (oben); die Kombination mit 60 min Hyperthermie bei 43°C beeinflusste den Effekt nicht (unten); als Ladekontrolle erfolgte ein Nachweis von GAPDH

Auf Proteinebene zeigte sich für MRP 1 direkt nach einer 24stündigen Behandlung mit 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C in den untersuchten BT-474-Zellen keine deutliche Änderung der MRP1-Expression (Abbildung 24 A), wobei nach einer Postinkubationszeit von 24 h die Expression auf im Mittel 80 % zurückging (Abbildung 25 A). In Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermiebehandlung vor der Behandlung mit 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C und einer Postinkubationszeit von 0 h wurde eine mittlere Abnahme von MRP 1 auf 49 % beobachtet (Abbildung 24 A). Durch die Kombination mit einer 60minütigen Hyperthermiebehandlung im Anschluss an die Chemotherapie wurde 24 h nach der Behandlung mit 0,15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C eine mittlere Abnahme auf 40 % beobachtet (Abbildung 25 A), die ohne Hyperthermie erst bei Einsatz einer 10fach höheren Konzentration zu sehen war.

Bei Behandlung mit einer Konzentration von 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ konnte eine mittlere Abnahme von MRP 1 auf 71 % direkt im Anschluss an die Behandlung (0h Postinkubationszeit, Abbildung 24 A), sowie auf 37 % nach weiteren 24 h beobachtet werden (Abbildung 25 A). In Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermiebehandlung vor der Behandlung 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C konnte nach einer Postinkubationszeit von 0 h eine mittlere Abnahme von MRP 1 auf 24 % beobachtet werden (Abbildung 24 A). In Kombination mit 60 min Hyperthermie nach der 24stündigen Behandlung mit 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C wurde die Abnahme nach 24 h auf 16 % verstärkt (Abbildung 25 A).

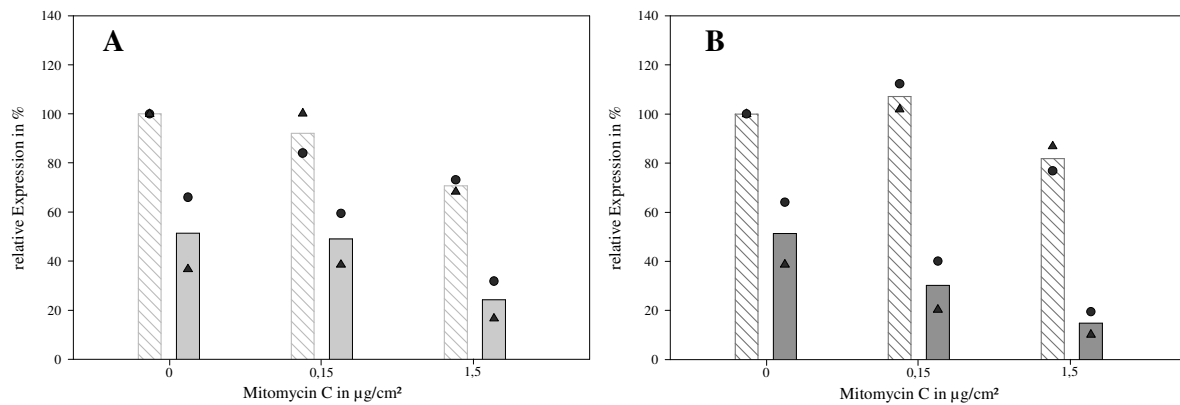


Abbildung 24: Auf Proteinebene kam es bei Behandlung von BT-474-Zellen mit 0,15 bzw. 1,5 µg/cm² Mitomycin C und einer Postinkubationszeit von 0 h zu einer mit steigender Mitomycin C – Konzentration stärker werdenden Abnahme von MRP 1 (A) und MRP 3 (B), die in Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermie (43°C) vor der Mitomycin C – Behandlung deutlich verstärkt werden konnte; dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (▲ Durchgang 1; ● Durchgang 2) und die Mittelwerte mit (▨, ▩) und ohne Hyperthermie (▨, ▩)

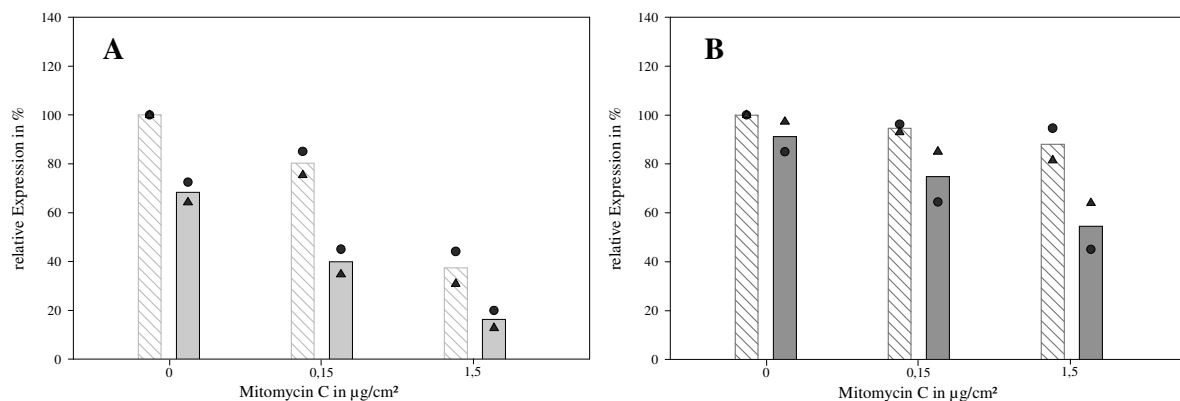


Abbildung 25: Auf Proteinebene kam es bei Behandlung von BT-474-Zellen mit 0,15 bzw. 1,5 µg/cm² Mitomycin C und einer Postinkubationszeit von 24 h zu einer mit steigender Mitomycin C – Konzentration zunehmenden Abnahme von MRP 1 (A) und MRP 3 (B), die in Kombination mit einer 60minütigen Hyperthermie (43°C) nach der Mitomycin C – Behandlung deutlich verstärkt werden konnte; dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (▲ Durchgang 1; ● Durchgang 2) und die Mittelwerte mit (▨, ▩) und ohne Hyperthermie (▨, ▩)

Für MRP 3 zeigten sich auf Proteinebene bei Behandlung mit 0,15 µg/cm² Mitomycin bei 0 und 24 h Postinkubationszeit keine Expressionsänderungen, während in Kombination mit einer 60minütigen Hyperthermiebehandlung eine Abnahme auf 75 % beobachtet werden konnte (Abbildung 25B), die in Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermiebehandlung vor der Chemotherapie und einer Postinkubationszeit von 0 h auf 30 % verstärkt wurde (Abbildung 24 B). Nach einer Behandlung mit 1,5 µg/cm² Mitomycin C und einer Postinkubationszeit von 0 bzw. 24 h kam es zu einer mittleren Abnahme von MRP 3 auf 82 bzw. 88 % in den untersuchten BT-474-Zellen (Abbildung 24 B und Abbildung 25 B). Durch

die Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermiebehandlung im Anschluss an die Behandlung mit $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C konnte diese Abnahme auf 15 % verstärkt werden (Abbildung 24 B), während in Kombination mit einer 60minütigen Hyperthermiebehandlung eine Abnahme auf 55 % beobachtet wurde (Abbildung 25 B).

Repräsentativ ist in Abbildung 26 ein Immunoblot dargestellt, der bei isointensem GAPDH-Signal eine deutliche, mit einer Erhöhung der Mitomycin C – Konzentration von 0,15 auf $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ stärker werdende Signalabnahme von MRP 1 (Abbildung 26 A oben) und MRP 3 (Abbildung 26 B oben) zeigt, die in Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermie vor der Chemotherapie verstärkt wird (Abbildung 26 A, B unten).

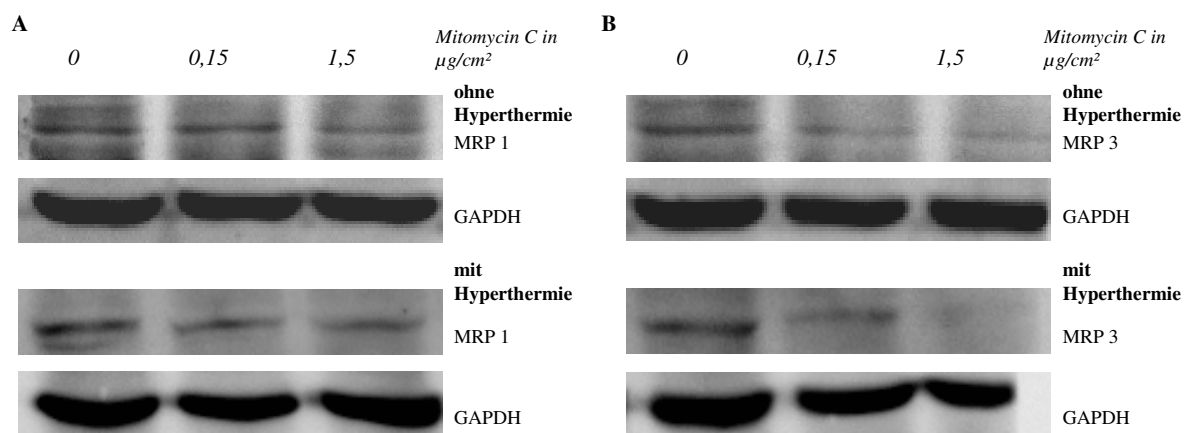


Abbildung 26: Repräsentatives Beispiel für die konzentrationsabhängige Abnahme der Expression von MRP 1 (A) und MRP 3 (B) auf Protein-Ebene nach Behandlung mit 0,15 bzw. $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C (oben), die in Kombination mit 90 min Hyperthermie (43°C) verstärkt wurde (unten); als Ladekontrolle erfolgte ein Nachweis von GAPDH

Damit konnte gezeigt werden, dass die Expression von MRP 1 und 3 mit zunehmender Konzentration an Mitomycin C auf Proteinebene, in höheren Konzentrationen auch auf RNA-Ebene abnimmt, was durch die Kombination mit Hyperthermie in Abhängigkeit der Hyperthermiedauer deutlich verstärkt wurde.

Während des gesamten Untersuchungszeitraums von 48 h wurde keine Veränderung des photometrischen Spektrums von Mitomycin C bei 37 bzw. 43°C beobachtet (Daten nicht gezeigt), sodass davon ausgegangen werden kann, dass Mitomycin C auf wärmeunbehandelte, wie auch auf wärmebehandelte Zellen in gleicher Form gewirkt hat.

5.5 Einfluss von magnetischen Eisenoxidnanopartikeln allein und in Kombination mit Hyperthermie auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 *in vitro*

Für die Behandlung von BT-474-Zellen mit dextranümhüllten Eisenoxidnanopartikeln wurde in der vorliegenden Arbeit bei konstanter RNA-Expression eine mit zunehmender Nanopartikelkonzentration stärker werdende Steigerung der Expression von MRP 1 auf Proteinebene beobachtet, die bei einer Konzentration von 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ mehr als das Doppelte des Kontrollniveaus betrug und in Kombination mit Hyperthermie in Abhängigkeit der Hyperthermiedauer in eine Abnahme überführt wurde. Für MRP 3 wurden ähnliche, aber schwächere Effekte beobachtet.

Bei der Inkubation der Eisenoxidnanopartikel für 7 Tage bei 37 °C in Zellkulturmedium konnte während der täglichen lichtmikroskopischen Kontrolle keine bakterielle Besiedlung festgestellt werden, womit die Sterilität der verwendeten Nanopartikel gezeigt werden konnte.

Auf RNA-Ebene wurde kein deutlicher Einfluss der Eisenoxidnanopartikel in den Konzentrationen 1,5, 15 und 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 beobachtet. Die zusätzliche hypertherme Behandlung (43 °C) für eine Dauer von 60 (Abbildung 27 A, C) bzw. 90 min (Abbildung 27 B, D) im Anschluss an die Inkubation der Eisenoxidnanopartikel beeinflusste die RNA-Expression von MRP 1 und 3 nicht.

Repräsentativ sind in Abbildung 28 als Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese aus RNA-Isolaten von BT-474-Zellen nach Behandlung mit 1,5, 15 und 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ Eisenoxidnanopartikeln allein und in Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermiebehandlung die isointensen MRP 1- (Abbildung 28 A) und MRP 3-Banden (Abbildung 28 B) bei isointensem GAPDH-Signal dargestellt.

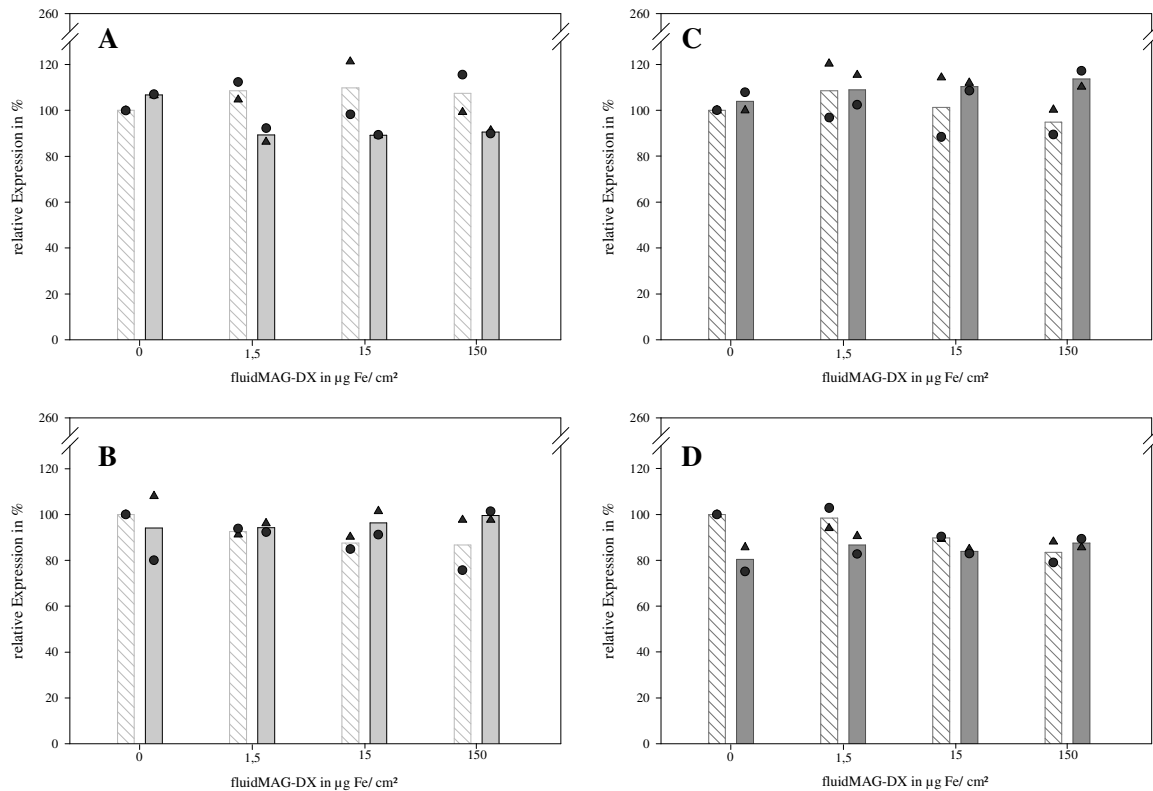


Abbildung 27: Auf RNA-Ebene zeigte sich keine deutliche Expressionänderung von MRP 1 (▨) und MRP 3 (■) in BT-474-Zellen 24 h nach der Behandlung mit dextranumhüllten Eisenoxidnanopartikeln allein und in Kombination mit 60 (A, C) bzw. 90 min (B, D) Hyperthermie bei 43°C; dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (▲ Durchgang 1; ● Durchgang 2), sowie die mittlere Expression (Balken) normiert auf GAPDH

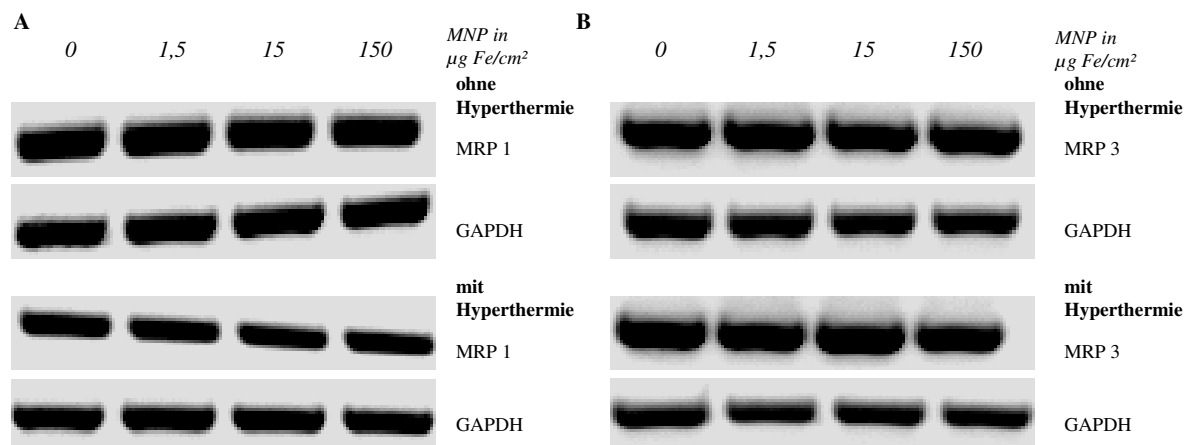


Abbildung 28: Repräsentatives Ergebnis einer konstanten Expression von MRP 1- bzw. MRP 3 auf RNA-Ebene in BT-474-Zellen 24 h nach Behandlung mit dextranumhüllten Eisenoxidnanopartikeln in den Konzentrationen 1,5, 15 und 150 µg Fe/cm² allein und unter dem zusätzlichen Einfluss von 90 min Hyperthermie (43°C) nach der Partikelinkubation; als Ladekontrolle wurde GAPDH mitgeführt

Auf Proteinebene konnte für MRP 1 24 h nach der Behandlung von BT-474-Zellen mit 1,5, 15 bzw. 150 µg Fe/cm² Eisenoxidnanopartikeln eine mittlere Erhöhung von MRP1 auf 131, 190 bzw. 216 % beobachtet werden (Abbildung 29 A). In Kombination mit 60 min

Hyperthermie sank die Expression nahezu auf Kontrollniveau (Abbildung 29 A), während in Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermiebehandlung eine Abnahme von MRP 1 unter Kontrollniveau beobachtet werden konnte, die mit steigender Partikelkonzentration verstärkt wurde und bei Inkubation von fluidMAG-DX in einer Konzentration von 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ eine mittlere Abnahme von 46 % erreichte (Abbildung 29 B).

Für MRP 3 wurde auf Proteinebene nach Behandlung mit fluidMAG-DX eine moderat erhöhte Expression beobachtet, die unabhängig von der eingesetzten Partikelkonzentration 120-125 % betrug (Abbildung 29 C). Bei Kombination der Behandlung mit einer 60minütigen Hyperthermiebehandlung sank die Expression von MRP 3 auf Kontrollniveau (Abbildung 29 C), während bei einer Hyperthermiedauer von 90 min Expression auf etwa 80 % des Kontrollniveaus zurückging (Abbildung 29 D).

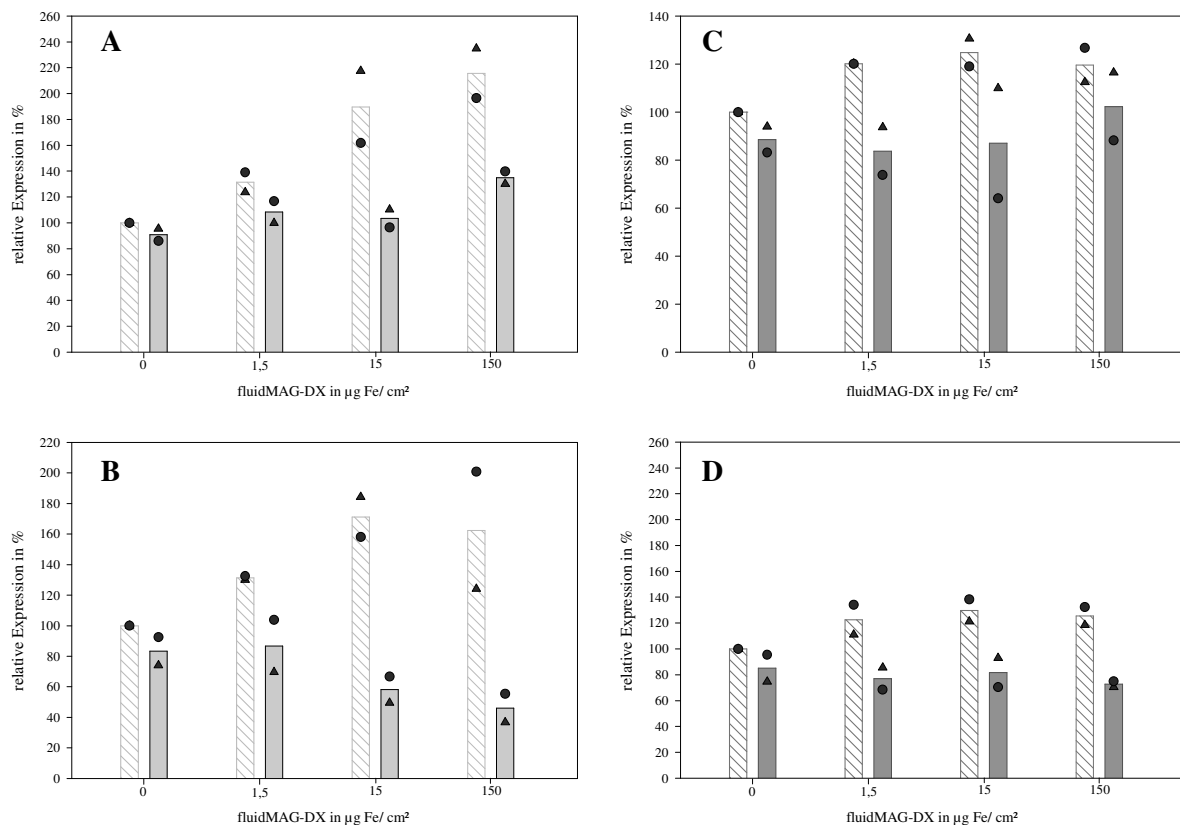


Abbildung 29: Mit steigender Partikelkonzentration zunehmende Steigerung der Proteinexpression von MRP 1 (A, B) und MRP 3 (C, D) bei Behandlung von BT-474-Zellen mit 1,5, 15 bzw. 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ Eisenoxidnanopartikeln und einer Postinkubationszeit von 24 h, die in Kombination mit einer 60minütigen Hyperthermie aufgehoben (A, C) und mit einer 90minütigen Hyperthermie in eine mit steigenden Partikelkonzentration stärker werdenden Abnahme von MRP 1 und MRP 3 (B, D) überführt wurde; dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (\blacktriangle Durchgang 1; \bullet Durchgang 2) und die Mittelwerte mit (□, ■) und ohne Hyperthermie (▨, ▩) normiert auf GAPDH

Repräsentativ ist in Abbildung 30 ein Immunoblot von Proteinisolaten aus mit Eisenoxidnanopartikeln allein und in Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermie behandelten BT-474-Zellen dargestellt. Dabei ist eine deutliche, von der Partikelkonzentration abhängige Steigerung des MRP 1 – Signals in Abwesenheit von Hyperthermie (Abbildung 30 A oben) bzw. Abnahme des MRP 1-Signals unter hyperthermen Bedingungen zu beobachten (Abbildung 30 A unten). Für MRP 3 ist eine moderate, von der Partikelkonzentration unabhängige Steigerung des Signals in Abwesenheit von Hyperthermie (Abbildung 30 B oben) und eine schwache, von der Partikelkonzentration abhängige Abnahme des MRP 3-Signals in Anwesenheit von Hyperthermie zu beobachten (Abbildung 30 B unten). Unterschiede im GAPDH-Signal wurden durch Normierung der semiquantitativen Messwerte auf GAPDH herausgerechnet.

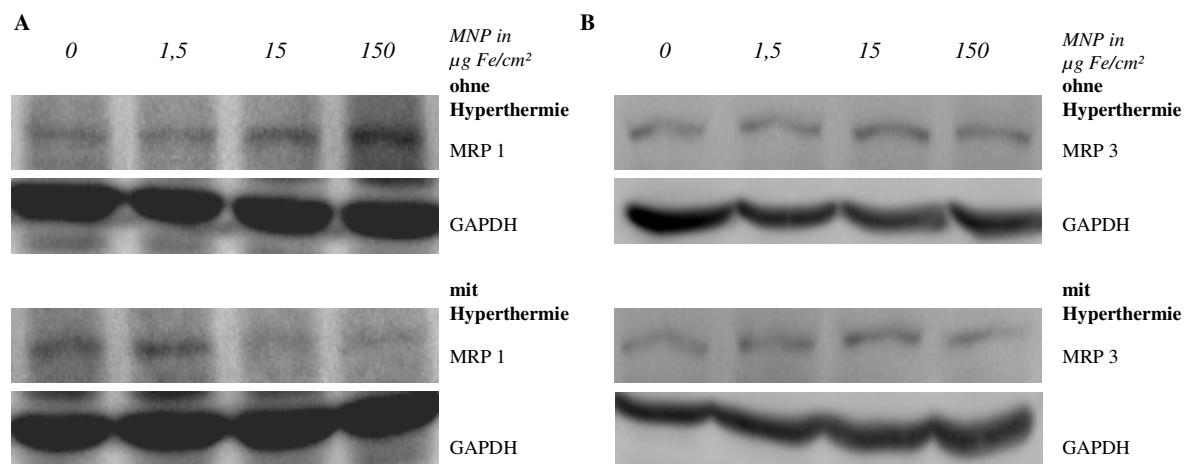


Abbildung 30: Repräsentatives Beispiel für die konzentrationsabhängige Zunahme der Proteinexpression von MRP 1 (A) und MRP 3 (B) nach Behandlung mit 1,5, 15 bzw. 150 µg Fe/cm² Eisenoxidnanopartikeln (MNP) (oben), die in Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermie in eine mit steigenden Partikelkonzentration stärker werdenden Abnahme von MRP 1 und MRP 3 (B, D) überführt wurde (unten); als Ladekontrolle diente GAPDH

5.6 Einfluss der Kombination von Hyperthermiebehandlung, Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 *in vitro*

Durch die kombinierte Behandlung von BT-474-Zellen mit magnetischen Eisenoxidnanopartikeln und Mitomycin C konnte die Protein- und RNA-Expression von MRP 1 und 3 von der Partikelkonzentration unabhängig gesenkt werden, wobei die Abnahme schwächer ausfiel als bei alleiniger Mitomycin C – Behandlung in äquivalenter Konzentration und in Kombination mit 90 min Hyperthermie moderat verstärkt wurde.

Auf mRNA-Ebene konnte nach der Behandlung mit 1,5, 15 bzw. 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ Eisenoxidnanopartikeln und 1,5 $\mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C eine moderate Abnahme von MRP 1, die keine deutliche Abhängigkeit von der inkubierten Partikelkonzentration zeigte (72, 80 bzw. 67 %) und durch eine zusätzliche 90minütige Hyperthermiebehandlung nur leicht angehoben wurde (80, 85, 80 %), beobachtet werden (Abbildung 31 A).

Die Expression von MRP 3 änderte sich durch die kombinierte Behandlung mit 1,5, 15 bzw. 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ Eisenoxidnanopartikeln und 1,5 $\mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C auf mRNA-Ebene im untersuchten Zeitfenster kaum, worauf eine zusätzliche Hyperthermiebehandlung keinen Einfluss hatte (Abbildung 31 B).

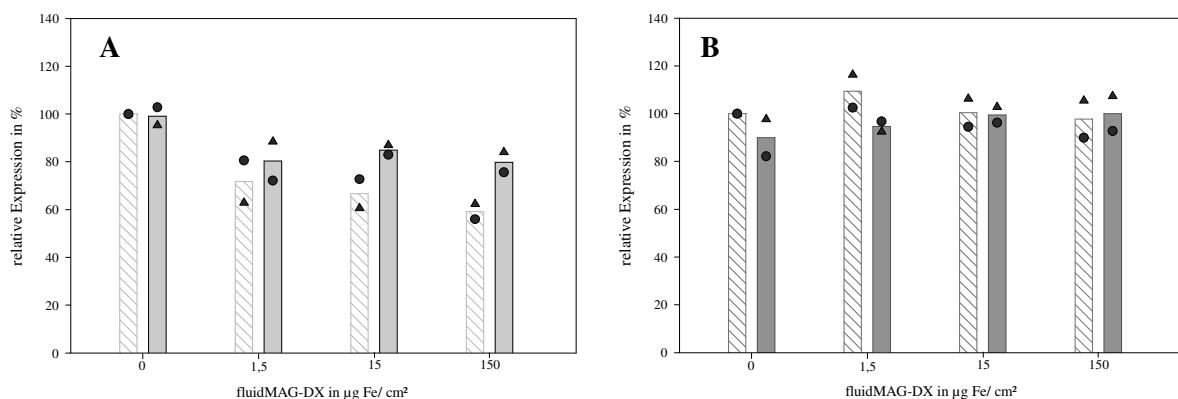


Abbildung 31: Auf RNA-Ebene zeigte sich eine moderate Abnahme von MRP 1 (▨) direkt nach Behandlung von BT-474-Zellen mit Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln, während sich MRP 3 (▩) auf RNA-Ebene nicht änderte; diese Effekte wurden durch die zusätzliche hypertherme Behandlung bei 43 °C (90 min) nicht beeinflusst; die Behandlung erfolgte für 22,5 h mit 1,5, 15 und 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ fluidMAG-DX, gefolgt von 90 min bei 43°C (▨, ▩) bzw. bei 37°C (▨, ▩) und 24h mit 1,5 $\mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (▲ Durchgang 1; ● Durchgang 2), sowie die mittlere Expression (Balken); Ergebnisse normiert auf GAPDH

Repräsentativ sind in Abbildung 32 die durch die kombinierte Behandlung von BT-474-Zellen mit Mitomycin C, Eisenoxidnanopartikeln und Hyperthermie schwach reduzierten MRP 1- (Abbildung 32 A) und isointensen MRP 3-Banden (Abbildung 32 B) bei isointensem GAPDH-Signal als Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese aus RNA-Isolaten dargestellt.

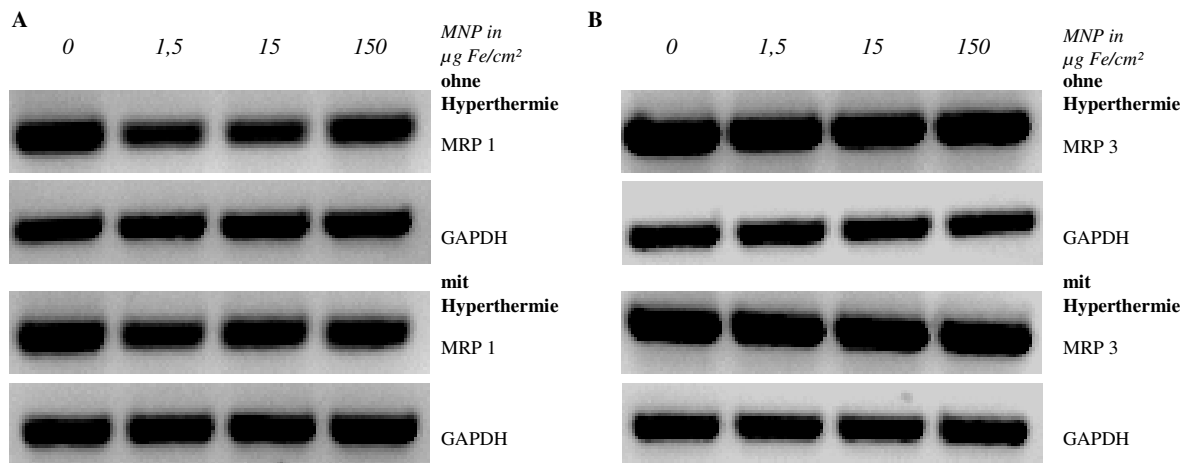


Abbildung 32: Repräsentatives Beispiel für die moderate, von der Nanopartikelkonzentration unabhängige Abnahme der Expression von MRP 1 (A) auf RNA-Ebene nach kombinierter Behandlung mit 1,5, 15 und 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ Eisenoxidnanopartikeln (MNP) und 1,5 $\mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C, bei konstanter Expression von MRP 3 (B) in BT-474 (oben); die Kombination mit 90 min Hyperthermie bei 43°C beeinflusste den Effekt nicht (unten); als Ladekontrolle erfolgte ein Nachweis von GAPDH

Auf Proteinebene wurde für MRP 1 nach Behandlung von BT-474-Zellen mit 1,5, 15 bzw. 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ fluidMAG-DX und 1,5 $\mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C direkt nach Ende der Inkubationszeit von Mitomycin C eine mittlere Abnahme von MRP 1 auf 68, 64 bzw. 63 % beobachtet. Durch eine zusätzliche Behandlung mit Hyperthermie für eine Dauer von 90 min wurde der beobachtete Effekt moderat auf 56, 49 bzw. 52% verstärkt (Abbildung 33 A).

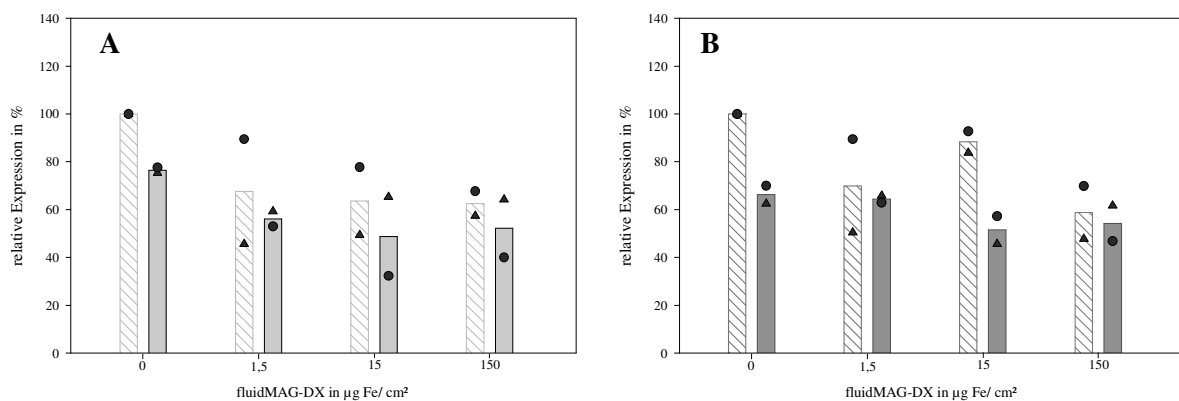


Abbildung 33: Bei Behandlung von BT-474-Zellen mit 1,5, 15 bzw. 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ Eisenoxidnanopartikeln und 1,5 $\mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C zeigte sich eine Abnahme von MRP 1 (A,) und MRP 3 (B,) auf Proteinebene, die durch eine zusätzliche 90minütige Hyperthermie nur leicht verstärkt wurde (,) ; die Behandlung erfolgte für 22,5 h mit 1,5. 15 und 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ fluidMAG-DX, gefolgt von 90 min bei 43°C bzw. bei 37°C und 24h mit 1,5 $\mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C; dargestellt sind die Ergebnisse der beiden Versuchsdurchführungen (\blacktriangle Durchgang 1; \bullet Durchgang 2) und die Mittelwerte mit (,) und ohne Hyperthermie (,) normiert auf GAPDH;

Für die Expression von MRP 3 wurde auf Proteinebene durch die kombinierte Behandlung mit 1,5, 15 bzw. 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ fluidMAG-DX und 1,5 $\mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C eine mittlere Abnahme auf 70, 88 bzw. 59 % beobachtet, die durch die Kombination mit einer 90 minütigen Hyperthermiebehandlung auf 64, 51 bzw. 54 % verstärkt wurde (Abbildung 33 B).

Repräsentativ ist in Abbildung 34 ein Immunoblot von Proteinisolaten aus mit Eisenoxidnanopartikeln und Mitomycin C in An- und Abwesenheit einer 90minütigen Hyperthermie behandelten BT-474-Zellen dargestellt. Dabei ist eine moderate, von der Partikelkonzentration nur schwach abhängige Abnahme des MRP 1- (Abbildung 34 A oben) und 3-Signals (Abbildung 34 B oben) in Abwesenheit von Hyperthermie zu beobachten, die durch die Kombination mit Hyperthermie nur leicht verstärkt wird (Abbildung 34 A, B unten). Unterschiede im GAPDH-Signal wurden durch Normierung der semiquantitativen Messwerte auf GAPDH herausgerechnet. Aufgrund der guten Korrelation beider Versuchsdurchgänge konnte die beobachtete Tendenz bestätigt und die semiquantitativen Daten gemittelt werden.

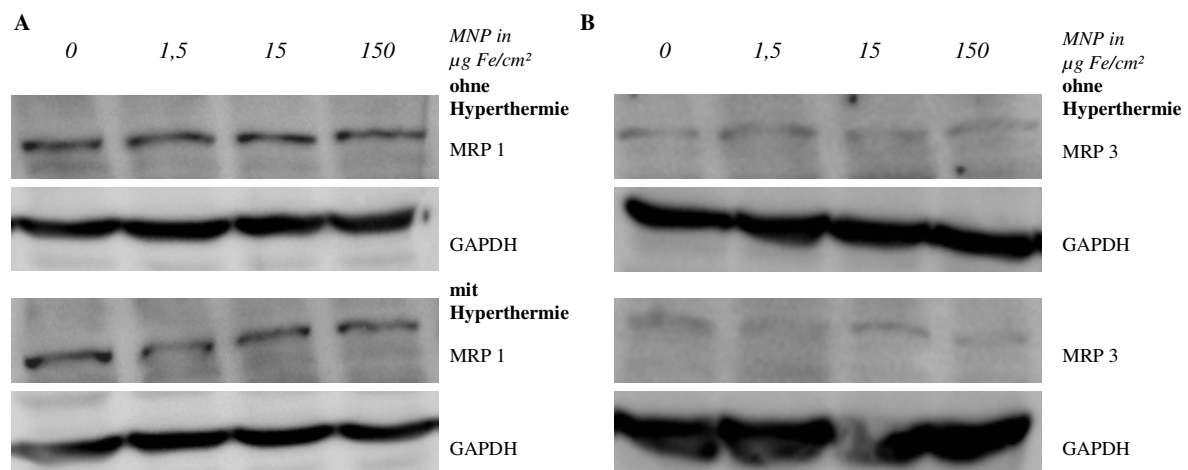


Abbildung 34: Repräsentatives Beispiel für die von der Partikelkonzentration unabhängige Abnahme der Proteinexpression von MRP 1 (A) und MRP 3 (B) nach Behandlung mit 1,5, 15 bzw. 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ Eisenoxidnanopartikeln (MNP) und 1,5 $\mu\text{g/cm}^2$ Mitomycin C (oben), die in Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermie nicht beeinflusst wurde (unten); als Ladekontrolle erfolgte ein Nachweis von GAPDH

5.7 Einfluss der Kombination von magnetischen Nanopartikeln, Mitomycin C und Hyperthermie auf die Vitalität von BT-474-Zellen

Für BT-474-Zellen konnten 24 h nach Behandlung mit 1,5, 15 bzw. 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ fluidMAG-DX in der hyperthermieunbehandelten wie auch in den 15 bzw. 90 min hyperthermiebehandelten Gruppen im enzymatischen Vitalitätstest (MTS-Test) keine einschränkenden Effekte auf die Zellvitalität beobachtet (Abbildung 35 B). Nach einer

24stündigen Inkubation mit Mitomycin C in einer Konzentration von $0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ traten mittelgradige Effekte (60,4 %) auf das Zellüberleben auf ($p < 0,001$). Bei einer Inkubation mit $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C wurde die Vitalität hochgradig (42,1 %) eingeschränkt ($p < 0,001$). Zwischen der Gruppe ohne Hyperthermiebehandlung und den Gruppen mit 15- bzw. 90minütiger Hyperthermiebehandlung traten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Überlebens auf (Abbildung 35 B). Durch die Kombination einer 24stündigen Inkubation von $1,5 \mu\text{g}$ Mitomycin C/ cm^2 im Anschluss an die Behandlung mit fluidMAG-DX ($1,5$, 15 bzw. $150 \mu\text{g}$ Fe/ cm^2) wurden hochgradig vitalitätseinschränkende Effekte (42,1; 38,8 bzw. 45,9 %) festgestellt (Abbildung 35 C), die sich nicht signifikant von der alleinigen Mitomycin-C-Behandlung unterschieden und durch eine zusätzliche Hyperthermiebehandlung für 15 bzw. 90 min nicht beeinflusst wurden (Abbildung 35 C).

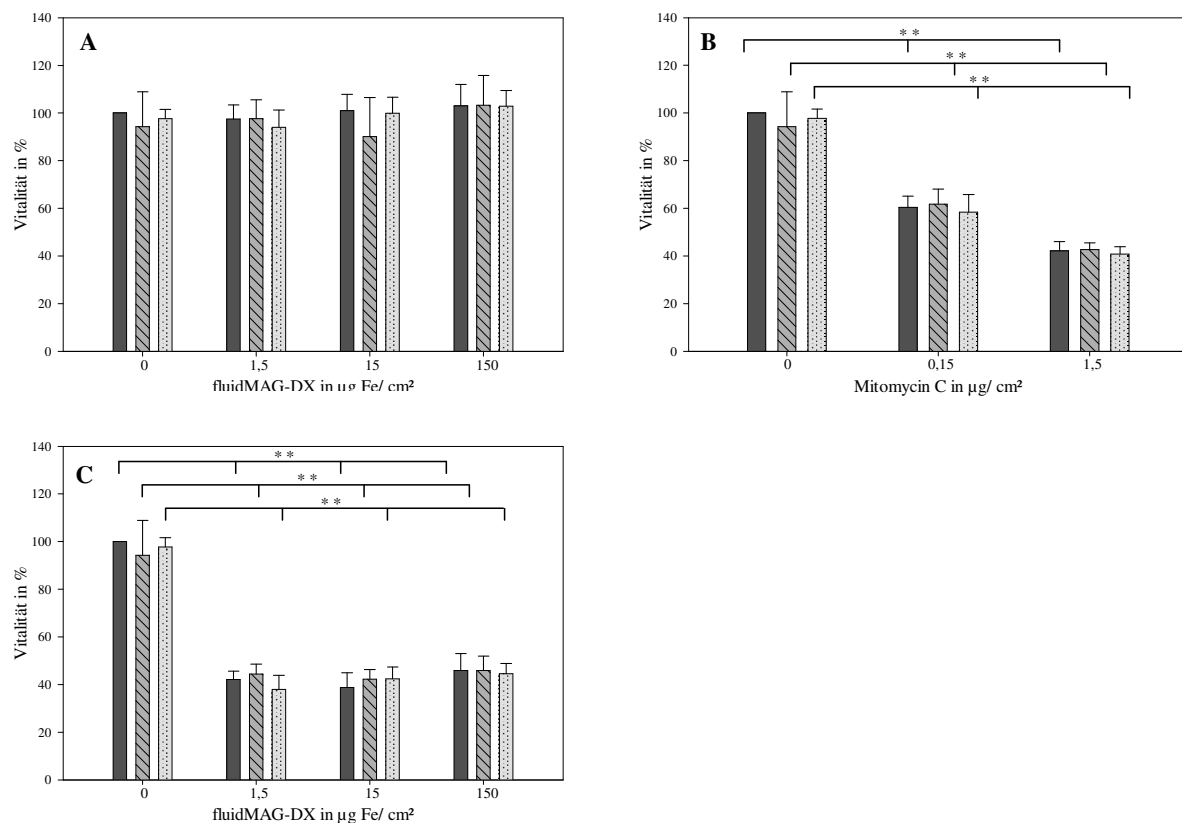


Abbildung 35: Vitalität von BT-474-Zellen 24 h nach Behandlung mit (A) magnetischen Eisenoxidnanopartikeln, (B) Mitomycin C und (C) Mitomycin C in Kombination mit magnetischen Eisenoxidnanopartikeln; (A) uneingeschränkte Vitalität nach Behandlung mit fluidMAG-DX für 24h in den Konzentrationen $1,5$, 15 und $150 \mu\text{g}$ Fe/ cm^2 und einer Postinkubationszeit von 24h; (B) konzentrationsabhängige Abnahme der Vitalität nach Behandlung mit $0,15$ und $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C für 24h; (C) von der Partikelkonzentration unabhängige Abnahme der Vitalität nach Behandlung mit fluidMAG-DX ($1,5$, 15 und $150 \mu\text{g}$ Fe/ cm^2) und $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin; durch die zusätzliche Behandlung mit einer 15 (schraffiert) bzw. 90minütigen (gepunktet) Hyperthermie bei 43°C im Anschluss an die Partikelinkubation wurde die beobachteten Effekte nicht beeinflusst; als Kontrolle wurde eine wärmeunbehandelte Gruppe mitgeführt (schwarz); ** $p < 0,001$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle der jeweiligen Gruppe

6 Diskussion

Zur Klärung der Frage, inwieweit die Einzelkomponenten (Hyperthermie, Mitomycin C, magnetische Eisenoxidnanopartikel) einer multivalenten magnetischen Hyperthermie und deren Kombination die Expression des ubiquitär exprimierten MRP 1 und des in resistenten Brustkrebszellen stark hochregulierten MRP 3 *in vitro* beeinflussen, konnte ein System zum Nachweis von MRP 1 und MRP 3 auf RNA- und Proteinebene in den humanen Adenokarzinomzellen MCF-7 etabliert werden. Im Anschluss konnte der Einfluss von Hyperthermie, Mitomycin C und Eisenoxidnanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 in BT-474-Zellen untersucht werden.

6.1 Optimierung des Nachweises von MRP 1 auf RNA- und Proteinebene

Zur Etablierung des Nachweises von MRP 1 und MRP 3 auf RNA- und Proteinebene wurde die für diese Proteine als positiv beschriebene Adenokarzinomzelllinie MCF-7 (Schrenk et al. 2001, Liu et al. 2005) herangezogen. In durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte zudem in dieser Arbeit nochmals bestätigt werden, dass MCF-7-Zellen für MRP 1 und MRP 3 positiv sind. Im Weiteren wurde die Adenokarzinomzelllinie BT-474 bezüglich der Expression von MRP 1 und 3 untersucht. Die Expression von MDR-Proteinen in BT-474-Zellen ist bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass eine Expression von MRP 1 und 3 in BT-474-Zellen, die signifikant höher als in MCF-7-Zellen war, vorliegt.

Bei der Optimierung der Darstellung von MRP 1 und MRP 3 auf RNA-Ebene wurde das High Pure RNA Isolation Kit (Roche diagnostics GmbH; Mannheim) verwendet. Außerdem wurde die Trizol[®]-Methode zur RNA-Isolation getestet. Hierbei bestätigte sich die aus der Literatur bekannte hohe Kontaminationen der RNA mit DNA, Proteinen und Guanidin-Isothiocyanat bei der Trizol[®]-Methode (Mannhalter et al. 2000), weshalb diese Methode als weniger geeignet für die RNA-Isolation eingeschätzt wird.

Für die Arbeit auf Proteinebene sollte eine Methode gefunden werden, die effektiv und routinemäßig eine Isolierung der membranständigen Proteine MRP 1 und 3 ermöglicht. Für die Wahl der Isolationsmethode stellen neben den Puffereigenschaften (pH-Wert, Ionenstärke, Protein-zu-Seife-Verhältnis) die erhebliche Größe der integralen Proteine (190 kDa) und der geringe Anteil am Gesamtproteingehalt Limitationen dar (Lehner et al. 2003, Rehm und Letzel 2010). Die Isolierung erfolgte mit der detergentienbasierten Methode nach Vellonen et al. (2010). Mit dieser Methode konnten das 190 kDa große MRP 1 bzw. 3 (Bakos und

Homolya 2007) vollständig, schnell und effizient isoliert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass nur mit diesem Puffer ein für Membranproteine notwendiges hydrophobes Milieu geschaffen werden konnte. Die Gesamtproteinisolation mittels RIPA-Puffer, die Isolation mittels Membrane Protein Extraction Reagent Kit (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) und das ProteoJET™ Membrane Protein Extraction Kit (Fermentas GmbH; Leon-Rot) waren dagegen ungeeignet, da Fragmente in der Größe einer Transmembrandomäne (50 – 70 kDa) detektiert wurden. Es wird von einer Fragmentierung durch Pufferbestandteile wie Natriumdesoxycholat (Rehm und Letzel 2010) ausgegangen. Außerdem kommen eine hitzeabhängige Spaltung zwischen den Aminosäuren Asparagin und Prolin (Kubo 1995) und eine Spaltung an proteasesensitiven Regionen (Hipfner et al. 1996, Yang et al. 2002) in Betracht. Die Percoll-Sucrose-Gradientenzentrifugation (Pertoft 2000, Lund et al. 2009, Yang et al. 2002, Wong et al. 2006, Wong et al. 2009) wird als ungeeignet zur effizienten und routinemäßigen Isolierung von MRP 1 bzw. 3 bewertet, da diese Methode zeitintensiv ist, für eine adäquate Proteinmenge viele Zellen benötigt werden ($0,17 \mu\text{g} / 1 \times 10^7$ Zellen, Lehner et al. 2003) und aufgrund störender Einflüsse von Pufferbestandteilen (Percoll, Sucrose) auf die Proteinbestimmung (Lund et al. 2009) diese Methode nicht reproduzierbar ist.

Die Bestimmung des Gesamt- bzw. Membranproteingehalts erfolgte mittels quantiPro-BCA-Assay (Sigma-Aldrich GmbH, München), da nur bei dieser Methode ein reproduzierbarer Gesamt- bzw. Membranproteinauftrag ermöglicht wurde. Das kann darauf zurückgeführt werden, dass nur hier die Zusammensetzung des für die detergentienbasierte Proteinisolation verwendeten Puffers im Soll-Bereich der Reinheit liegt (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Übersicht über die maximalen Konzentrationen der Pufferbestandteile für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proteinisolationmethoden, die keine Störung des Proteinassays verursachen (modifiziert nach Simonian und Smith 2006, Olson und Markwell 2007); Beurteilung in Bezug auf die verwendete detergentienbasierte Proteinisolationmethode (Detergentienpuffer nach Vellonen et al, 2010): Pufferzusätze liegen innerhalb (<) bzw. außerhalb (>) des Soll-Bereichs; (-) kein Pufferbestandteil

Substanz	quantiPro-BCA		Bradford-Methode		NanoDrop	
	Soll	Detergentien-puffer	Soll	Detergentien-puffer	Soll	Detergentien-puffer
Tris (M)	0,05	<	0,5	<	2	>
Natrium-Desoxycholat (%)	5	-	0,3	-	0,05	-
Triton-X100 (%)	5	<	0,02	>	0,125	>
SDS (%)	5	-	0,1	-	0,125	-
EDTA (mM)	0,05	<	30	<	100	<
Sucrose (%)	4	-	2 M	-	10	-
Hepes (mM)	100	-	n.N.	-	100	-

Es wurden außerdem die direkt photometrische Proteinbestimmung durch Messung der Absorption bei 280 nm im NanoDrop und die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976) ausprobiert. Bei der direkt photometrischen Proteinbestimmung wurden deutlich höhere Werte ermittelt als indirekt, was auf eine erhebliche Störung der Messung durch Substanzen, deren Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt (v.a. Triton-X100) (Ward und Fastiggi 1972, Simonian und Smith 2006, Rehm und Letzel 2010), zurückgeführt werden kann. Mit der indirekten Proteinbestimmung nach Bradford (1972) wurde kein einheitlicher Gesamtproteineinsatz in die SDS-PAGE und somit kein reproduzierbares Ergebnis erzielt, was auf die den Soll-Bereich (siehe Tabelle 20) überschreitenden Pufferbestandteile zurückzuführen sein könnte (Brown et al. 1989).

Für die Durchführung der SDS-PAGE zur gelelektrophoretischen Trennung von Gesamtproteinen und dem anschließenden Nachweis von MRP 1 und MRP 3 konnten die aus der Literatur bekannten Parameter (10 %iges Trenn- und ein 4,3 %iges Sammelgel; Verwendung des beschriebenen SDS-Probenpuffers) bestätigt werden (Rajagopal und Simon 2003, Coley 2008, Jiang et al. 2009). In der Immunodetektion von MRP 1 bzw. 3 wurden dunkle Flecken, die sich über die gesamten Membranen zogen, erhalten. Durch das Austauschen von Blocksubstanz (Milchpulver bzw. BSA gegen die synthetische Roti-Block-Lösung), verwendetem Gerät (Rollermischer bzw. Schüttelinkubator gegen Taumelmischer) und Sekundärantikörperkonzentration (1:1000 auf 1:2500), sowie dem Filtern der verwendeten Substanzen konnten die schwarzen Flecken behoben und eine zufrieden stellende Darstellung erzielt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine unspezifische Reaktion zwischen den Antikörpern, dem Blocking-Reagenz und/ oder der PVDF-Membran bzw. den auf ihr gebundenen Proteinen erfolgte (Gallagher et al. 2001).

6.2 Einfluss von Hyperthermie, Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln auf die Expression von MRP 1 und 3 *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Behandlung von BT-474-Zellen bei 43 °C über einen Zeitraum von 15 bis 120 min gezeigt werden, dass es ab einer Behandlungsdauer von 60 min zu einer Abnahme der Proteinexpression von MRP 1 und MRP 3 kommt. Diese lag bei Erhöhung auf eine Behandlungszeit von 90 min über den gesamten Postinkubationszeitraum (0, 2, 24, 48 h) unter 50 % des Kontrollniveaus und wurde bei weiterer Erhöhung der Behandlungsdauer auf 120 min nur leicht verstärkt. Betrachtet man die Expression von MRP 1 und 3 in Abhängigkeit der Hyperthermiedauer, fällt außerdem auf,

dass nach einer kurzen Behandlungsdauer von 15 und 30 Minuten eine Steigerung, insbesondere von MRP 1, auftrat.

Vergleichbare Untersuchungen zum Einfluss von Hyperthermie bei 43 °C auf die Proteine MRP 1 und MRP 3 in Adenokarzinomzellen sind bisher nicht vorhanden. Zhang et al. (2003) und Yang et al. (1995) konnten bei einer Behandlung mit 41 °C eine Abnahme von MRP 1 beobachten. Der Einfluss von Hyperthermie auf andere Mitglieder der Familie der MDR-Proteine (insbesondere das in der Struktur den MRP-Proteinen ähnliche P-Glycoprotein/MDR 1), wird derzeit kontrovers diskutiert. Von einigen Arbeitsgruppen wird eine mit steigender Hyperthermiedauer zunehmende Hochregulation von P-Glycoprotein beschrieben (Chin et al. 1990, Hever-Szabo et al. 1998, Vilaboa et al. 2000, Wartenberg et al. 2005a). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beobachteten Moriyama-Gonda et al. in den Prostatacarzinomzellen PC3 nach einer 60minütigen Wärmebehandlung bei 44 °C eine Herunterregulation von P-Glycoprotein (Moriyama-Gonda et al. 1998). Auch bei 40 – 42 °C konnte eine Abnahme von P-Glycoprotein gezeigt werden (Zhang et al. 2003, Wei et al. 2007). Wartenberg et al. (2005a) diskutieren, dass MDR-Proteine in unterschiedlicher Weise auf Stressoren, insbesondere auf Hyperthermie, reagieren und das Ausmaß der Expressionsänderung nicht nur von Dauer und Temperatur der Hyperthermiebehandlung, sondern auch von der verwendeten Zelllinie und deren Wachstumsverhalten abhängt (Wartenberg et al. 2005a). Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Herunterregulation von MRP 1 und 3 ab einer Behandlungsdauer von 60 min bei 43 °C kann damit ein Hinweis darauf sein, dass auch die Subfamilien der MDR-Proteine in unterschiedlicher Weise auf thermale Reize reagieren. Wie aus der Literatur ersichtlich, ist die Frage, ob MDR-Proteine im Rahmen einer Hyperthermiebehandlung hoch- oder herunterreguliert werden, nicht einheitlich zu beantworten und scheint von Behandlungsdauer und –temperatur, der Zelllinie und deren Größe abzuhängen.

Die molekularen Mechanismen, die zu der beobachteten Abnahme der Proteinexpression führen könnten, sind bisher noch nicht aufgeklärt. Während für P-Glycoprotein aufgrund einer synergistischen Reaktion der RNA (Chin et al. 1990, Vilaboa et al. 2000, Wartenberg et al. 2005a) Effekte auf Transkriptionsebene diskutiert werden (Chin et al. 1990, Kioka et al. 1992, Miyazaki et al. 1992, Pallis et al. 1997, Vilaboa et al. 2000, Wartenberg et al. 2005a), scheint diese Ebene der Regulation für MRP 1 und 3 unwahrscheinlich. Bei einer Regulation auf RNA-Ebene wäre eine Herunterregulation der RNA vor dem Absinken der Proteinexpression zu erwarten. Da zu keiner der Postinkubationszeiten Effekte auf RNA-Ebene gefunden wurden und bereits bei einer Postinkubationszeit von 0 h maximale Effekte auf Proteinebene

auftraten (< 50 % des Kontrollniveaus), ist der regulatorische Mechanismus eher auf Proteinebene (Proteinsynthese, posttranslatorische Modifikation) zu vermuten. Mit dem derzeitigen Wissensstand kommen drei mögliche Mechanismen in Betracht: Redoxregulation, Verlagerung aus subzellulären MRP-Speicherpools und ein verminderter Einbau in die Zellmembran. ABC-Transporter verfügen über redoxsensitive Aminosäuren wie Cystein, über die intramolekulare Disulfidformationen gebildet werden können, die eine korrekte Faltung des Proteins und folglich dessen Stabilität gewährleisten (Kuo 2009). Eine Redoxregulation über Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wurde bereits für den MDR-Transporter P-Glycoprotein nachgewiesen (Ziemann et al. 1999, Wartenberg et al. 2001, Wartenberg et al. 2005a, Wartenberg et al. 2005b, Wartenberg et al. 2001, Li et al. 2006, Cai et al. 2007, Huang et al. 2008, Huang et al. 2008, Kuo 2009, Alakhova et al. 2009, Liu 2009). Die Richtung der Beeinflussung der Expression von P-Glycoprotein hängt dabei maßgeblich vom basalen ROS-Gehalt (Wartenberg et al. 2005b, Huang et al. 2008), der untersuchten Zelllinie und deren Wachstumsverhalten ab (Wartenberg et al. 2005b): Niedrige Level an ROS führen zu einer Hochregulation (Ziemann et al. 1999, Wartenberg et al. 2005a), hohe ROS-Level zu einer Herunterregulation von P-Glycoprotein (Wartenberg et al. 2001, Li et al. 2006, Cai et al. 2007, Huang et al. 2008, Kuo 2009, Alakhova et al. 2009, Liu 2009). Da in der Nähe des MRP 1 – Promotors oxidative responsive elements (OREs) gefunden wurden, wird auch für MRP 1 eine Regulation über Redoxmechanismen diskutiert (Kuo et al. 1998). Untersuchungen für MRP 3 sind noch nicht vorhanden. Zieht man Parallelen zu den für P-Glycoprotein untersuchten und möglicherweise auf MRP 1 und 3 übertragbaren Mechanismen, so könnte die zu Beginn der Hyperthermie (bis 30 min) beobachtete Hochregulation von MRP 1 und 3 auf einen basal niedrigen ROS-Gehalt zurückzuführen sein. Unter erhöhten Temperaturen steigt der intrazelluläre Gehalt an ROS an (Wartenberg et al. 2005b, Kuo 2009). Durch das daraus resultierende, gehobene ROS-Level könnte die bei anhaltender Hyperthermie (ab 60 min) beobachtete Herunterregulation von MRP 1 und 3 erklärt werden. Eine zweite mögliche Erklärung für die molekularen Mechanismen hinter der beobachteten Expressionsänderung von MRP 1 und 3 auf Proteinebene kann in der subzellulären Lokalisation von MRP-Proteinen gesucht werden. Es wird diskutiert, ob diese subzellulären Formen Speicherpools für eine kurzfristige Expressionsänderung auf Proteinebene darstellen (Almquist et al. 1995, Rajagopal und Simon 2003, Gennuso et al. 2004, Van Luyn et al. 1998). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass es bei erhöhten Temperaturen zu einem verminderten Einbau von P-Glycoprotein in die Membran zellfreier Translationssysteme kommt (Zhang und Chong 1996). Überträgt man diese Mechanismen auf die von uns beobachtete Herunterregulation

von MRP 1 und 3 bei erhöhten Temperaturen, könnte man vermuten, dass es zu einer direkten, möglicherweise ROS-getriggerten Hemmung des Einbaus von MRP 1 bzw. 3 in die Zellmembran gekommen sein könnte. Als dritter Mechanismus kann die Beeinflussung der Stabilität von MRP 1 und MRP 3 durch die Erhöhung der Fluidität der Membran infolge des Wärmereizes diskutiert werden (Zhang und Ling 1995). Damit könnte eine Abnahme der Membranproteine MRP 1 und 3 erklärt werden. Inwieweit dies zu einem Abbau von MRP-Proteinen aus der Zellmembran führen kann, ist noch nicht bekannt. Ob einer dieser posttranslationalen Regulationsmechanismen für die zeitnahe Abnahme von MRP 1 und 3 in der Zellmembran nach ausreichend langer Wärmebehandlung verantwortlich zu machen ist, ist mit derzeitigen Kenntnissen nicht abschließend zu beantworten. Dazu sind in Zukunft Untersuchungen a) zur Interaktion von ROS, MRP 1 bzw. 3 und Hyperthermie, b) zur subzellulären Lokalisation von MRP 1 und 3 und c) zur Integrität und Stabilität von MRP 1 und 3 bei erhöhten Temperaturen notwendig.

In Bezug auf präklinische und klinische Untersuchungen könnte die beobachtete Abnahme von MRP 1 und 3 durch die Wärmebehandlung eine mögliche Erklärung des für die Kombination von Hyperthermie und Chemotherapie bekannten additiven Effektes (Herman et al. 1990, Hildebrandt et al. 2002, Schlemmer et al. 2004, van der Heijden et al. 2005, Kampinga 2006, Bergs et al. 2007) sein: Aufgrund der hyperthermieassoziierten reduzierten Expression von MRP 1 bzw. 3 wird der Efflux des Chemotherapeutikums unterbunden und damit die intrazelluläre Konzentration des Chemotherapeutikums erhöht, so dass dieses verstärkt wirken kann. Offen bleibt dabei die Frage, ob gleichzeitig mit der Abnahme von MRP 1 bzw. 3 auf Proteinebene auch die Funktionalität der Proteine abnimmt. Dies müsste im Rahmen eines Funktionalitätstests (z.B. Calcein-AM-Assay) überprüft werden. Klinisch von großer Bedeutung erscheint ferner die Frage nach der optimalen Dauer der Hyperthermiebehandlung. Aktuell variiert die Dauer der hyperthermen Behandlung in der Klinik zwischen 60 (Wust et al. 2002, Hegewisch-Becker et al. 2002) und 120 Minuten (van der Zee 2002, Schlemmer et al. 2004). Da in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Abnahme von MRP 1 und 3 auf unter 50 % erst ab einer Behandlungsdauer von 90 Minuten beobachtet wurde, scheint gerade für eine Thermochemotherapie eine Behandlung für mindestens 90 Minuten bei 43°C für ein möglichst hohes Ansprechen der Chemotherapie erstrebenswert zu sein. In Anbetracht der kontroversen Diskussion über das Zeitfenster zwischen der Thermochemotherapie und der Chemotherapie (Roigas et al. 1998, van der Zee 2002, Mohamed et al. 2006, Issels 2008) kann aus der schon bei einer Postinkubationszeit von 0 h beobachteten

Abnahme von MRP 1 und 3 ein direkter Anschluss beider Therapiemodalitäten für günstig betrachtet werden.

Bei der Behandlung von BT-474-Zellen mit Mitomycin C wurde in einer Konzentration von $0,15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ keine Änderung von MRP 1 auf RNA-Ebene festgestellt (0 und 24 h Postinkubationszeit). Bei einer Behandlung mit $1,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin kam es zu einer deutlichen Abnahme von MRP 1-mRNA auf unter 50 %, die bei einer Postinkubationszeit von 0 h deutlich stärker ausfiel, als nach 24 h., sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Regulation a) schnell eintritt oder b) schon während der 24stündigen Inkubation von Mitomycin C einsetzte. Im Gegensatz dazu wurde auf RNA-Ebene für MRP 3 keine Expressionsänderung unter dem Einfluss von Mitomycin C beobachtet. Auf Proteinebene wurde eine mit zunehmender Mitomycin C – Konzentration zunehmende Abnahme von MRP 1 beobachtet, die 24 h nach der Behandlung stärker war (unter 50 %) als direkt nach der Behandlung (80 %). Für MRP 3 wurde auf Proteinebene ein ähnliches, aber deutlich schwächeres Verhalten beobachtet.

Der Einfluss von Mitomycin C auf die Transporter MRP 1 und 3 ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Vergleichbare Untersuchungen liegen für das den beiden Proteinen verwandte P-Glycoprotein vor. Es ist bekannt, dass Mitomycin C im Gegensatz zu der expressionssteigernden Wirkung verschiedener Chemotherapeutika, wie z.B. Doxorubicin (Zhou 2008), zu einer Abnahme von P-Glycoprotein führt (Ihnat et al. 1997, Maitra et al. 2001b). Die maximalen Effekte variieren zwischen den untersuchten Zelllinien und wurden im Bereich von 24 – 96 h nach der Behandlung beobachtet (Ihnat et al. 1997). Da auch für andere quervernetzende Substanzen reduzierende Wirkungen auf die Expression von P-Glycoprotein bekannt sind (Ihnat et al. 1997, Zhou 2008), muss zur Klärung der Frage, auf welchem Weg Mitomycin C die Expression von MDR-Proteinen beeinflusst, ein Blick auf die Wirkungsweise der Substanz geworfen werden: Nach Aufnahme in die Zelle und intrazellulärer Aktivierung von Mitomycin C wird eine Kaskade chemischer Reaktionen in Gang gesetzt, aus der verschiedene DNA-reaktive Spezies hervorgehen. Durch Mitomycin C kommt es schließlich zur Alkylierung, Monoadduktbildung und Quervernetzung der DNA an Guanidinresten, was zum Zellarrest und daraufhin zum Zelluntergang führt (Tomasz und Palom 1997). Es gibt Hinweise, dass die Quervernetzung durch Mitomycin C nicht zufällig abläuft, sondern auf den Promotor von induzierbaren Genen beschränkt ist. Verschiedene konstitutiv exprimierte Gene (Beta-Aktin, Transferrin, Albumin) werden durch quervernetzende Substanzen nicht beeinflusst (Caron und Hamilton 1995, Caron und

Hamilton 1998, Hamilton et al. 1998, Maitra et al. 2001b). Hamilton et al. stellten die Hypothese auf, dass die durch quervernetzende Substanzen verursachten DNA-Läsionen zu Veränderungen spezifischer DNA-Protein-Interaktionen (u.a. die Bindung von Transkriptionsfaktoren) im Chromatin induzierbarer Gene führen (Caron und Hamilton 1998). Diese Selektivität des Angriffs auf induzierbare Gene kann auf große Regionen nicht nukleosomaler, dekontensierter DNA zurückgeführt werden, die einen guten Angriffspunkt für quervernetzende Substanzen darstellen. Damit wird die de-novo-Synthese unterbunden, was durch die zeitversetzt beobachtete Abnahme von MRP 1 und 3 auf Proteinebene nach Behandlung mit Mitomycin C bestätigt wird. Außerdem muss beachtet werden, dass MRP 1 und MRP 3 in unterschiedlichem Ausmaß auf die Behandlung mit Mitomycin C reagierten: Beide MDR-Transporter zeigten eine Abnahme, die jedoch bei MRP 1 deutlich stärker ausgeprägt war. Eine mögliche Ursache könnte in der unterschiedlichen basalen Expression von MRP 1 (ubiquitär) und MRP 3 (selektiv, insbesondere in der Leber) und einer daraus resultierenden unterschiedlichen Aufgabe bzw. Funktionalität liegen. Es könnte ein ungleich starkes Ansprechen auf Stresssituationen bzw. eine unterschiedliche Reizschwelle zugrunde liegen. Neben der direkten Wirkung von Mitomycin C auf die Transkription induzierbarer Gene gibt es Hinweise, dass es noch einen zweiten Angriffspunkt auf Reifung und Trafficking von MDR-Proteinen geben muss (Ihnat et al. 1997, Maitra et al. 2001b, Hueber et al. 2008). Maitra et al. beobachteten direkt nach einer 4stündigen Behandlung mit Mitomycin C eine Erhöhung des membranständigen P-Glycoproteins bei konstantem Gesamt-P-Glycoproteingehalt, bevor nach 12 – 24 Stunden eine Abnahme des gesamten P-Glycoproteins eintrat (Maitra et al. 2001b). Dies lässt vermuten, dass es in Anwesenheit von Mitomycin C zunächst zu einer Umlagerung intrazellulärer Speicher-Pools von MDR-Proteinen (Almquist et al. 1995, Rajagopal und Simon 2003, Gennuso et al. 2004, Van Luyn et al. 1998) in die Zellmembran kommt. Da in der vorliegenden Arbeit die Expression von MRP 1 und 3 0 und 24 h nach einer Inkubationszeit von 24 h untersucht wurde, besteht durchaus die Möglichkeit, dass es zu einer Erhöhung während der Behandlung mit Mitomycin C gekommen ist, die am Ende der Inkubationszeit nicht mehr detektiert werden konnte. Um dies zu klären, müssen Expressionsanalysen noch während der Inkubationszeit (z.B. 2, 4, 8 und 12 h nach Beginn der Inkubation von Mitomycin C) erfolgen.

Was passiert nun, wenn man Hyperthermie und Mitomycin C, die beide zu einer Abnahme von MRP 1 und 3 führen, kombiniert? Durch die Kombination einer 60minütigen Hyperthermie *im Anschluss* an die 24stündige Behandlung mit 0,15 µg/cm² Mitomycin C konnte bei einer Postinkubationszeit von 24 h auf Proteinebene eine Abnahme von MRP 1

beobachtet werden (40 %) für die ohne Hyperthermie eine 10fach höhere Konzentration nötig war. Bei Behandlung mit 1,5 µg MMC/ cm² und 60 min Hyperthermie konnte die Expression von MRP 1 auf unter 20 % gesenkt werden. Für MRP 3 wurden ähnliche, aber schwächere Effekte beobachtet (ohne bzw. mit Hyperthermie: 0,15 µg/cm²: 95 bzw. 75 %, 1,5 µg/cm²: 88 bzw. 55 %). In Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermie *vor* der 24stündigen Behandlung wurden bei einer Postinkubationszeit von 0 h ähnlich expressionsreduzierende Effekte auf die Proteinexpression von MRP 1 und 3 wie bei einer 60minütigen Anschlusshyperthermiebehandlung erzielt (MRP 1 ohne bzw. mit Hyperthermie: 0,15 µg/cm²: 92 bzw. 49 %, 1,5 µg/cm²: 70 bzw. 24 %; MRP 3 ohne bzw. mit Hyperthermie: 0,15 µg/cm²: 100 bzw. 30 %, 1,5 µg/cm²: 82 bzw. 15 %). Vergleichbare Untersuchungen bezüglich der Expression von MRP 1 und 3 oder anderen Transportern der MDR-Familie unter kombinierter Behandlung mit Mitomycin C und Hyperthermie sind aus der Literatur nicht bekannt. Da aus den Ergebnissen unter normothermen Bedingungen hervorgeht, dass sich die hemmenden Effekte auf die Expression von MRP 1 und 3 nach 24 h verstärken, kann vermutet werden, dass die Effekte einer 90 minütigen Hyperthermiebehandlung vor der Mitomycingabe nach weiteren 24 h noch stärker ausfallen und somit unterschätzt werden. Daher kann derzeit noch keine endgültige Antwort auf die klinisch bedeutsame Frage, ob die Hyperthermiebehandlung vor oder nach der Chemotherapie erfolgen sollte, gegeben werden. Zur Eingrenzung des Zeitfensters müssen sich weitere *in vitro* Untersuchungen anschließen, z.B. der Vergleich der 90minütigen Hyperthermiebehandlung vor der Mitomycinbehandlung mit einer 60minütigen Hyperthermiebehandlung vor der Gabe von Mitomycin C. Eine Erklärung für die beobachteten Effekte kann in der molekularen Wirkung der Hyperthermie gesucht werden (siehe Abbildung 36): Mitomycin C verursacht u.a. DNA-Quervernetzungen und Alkylierungen, die aufgrund der Hemmung von DNA-Reparationsenzymen unter hyperthermen Bedingungen (Roti Roti 2007) nicht mehr behoben werden können. Damit werden sublethale in lethale Schäden überführt und Konzentrationen von Mitomycin C, die unter normothermen Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression von MRP 1 und MRP 3 hatten, führen zu einer deutlichen Abnahme der MRP 1 und 3 – Expression. Mit den vorliegenden Ergebnissen kann eine mögliche Erklärung für die klinische Erfahrung, dass die Wirkung von Zytostatika bei erhöhten Temperaturen verstärkt wird (van der Zee 2002, Issels 2008, Roigas et al. 1998), geben werden: Durch die Herunterregulation von Effluxtransportern (MRP 1 und 3) unter hyperthermen Bedingungen wird das Zytostatikum vermindert aus der Zelle heraustransportiert und kann somit in höherer Konzentration zytotoxisch wirken.

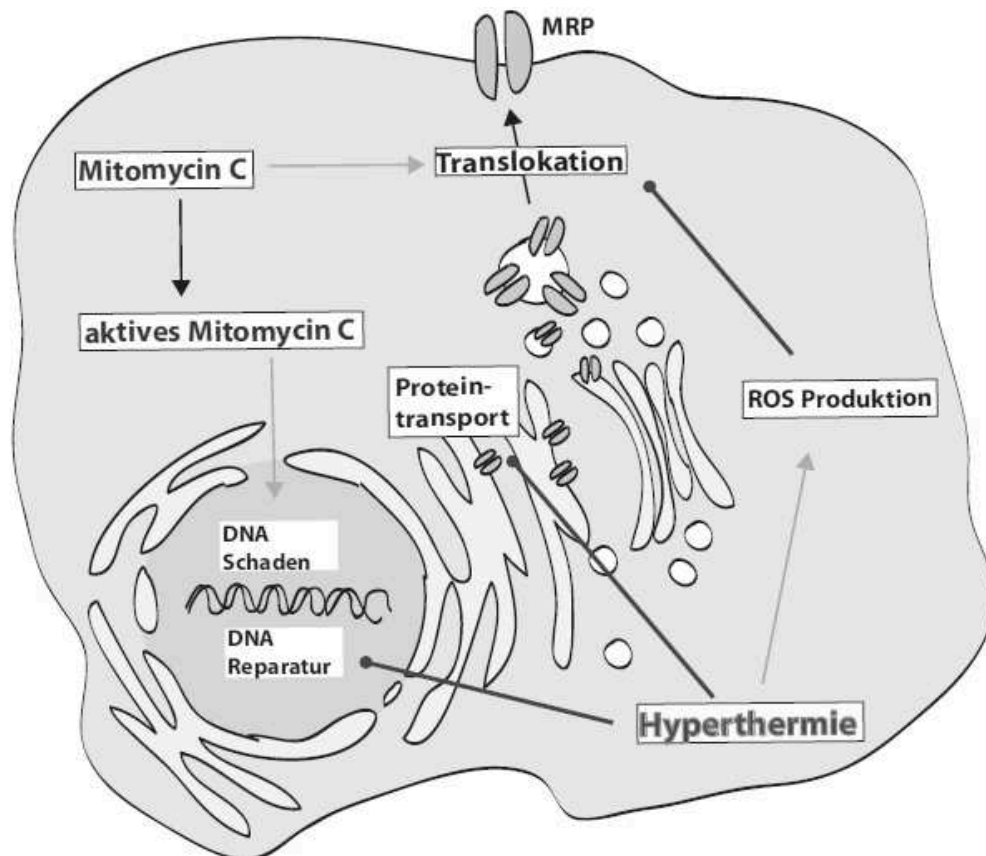


Abbildung 36: Möglicher Wirkmechanismus von Mitomycin C und Hyperthermie, der zu einer Abnahme der Expression von MRP 1 bzw. MRP 3 (00) führt; nachdem Mitomycin C in die Zelle aufgenommen wurde, wird dieses durch eine Reihe chemischer Umwandlungen in die aktive Wirkform überführt, die zu Quervernetzungen in der DNA und damit zu einer Transkriptionsblockade induzierbarer Gene führt; unter dem zusätzlichen Einfluss von Hyperthermie werden sublethale in lethale Zellschäden durch Hemmung von DNA-Reparaturenzymen überführt; für Hyperthermie werden weitere hemmende Einflüsse auf die Regulation von Translation, Translokation und Redoxstatus diskutiert; Einzelheiten siehe Text; MRP, Multidrug Resistance assoziierte Proteine; ROS, Reaktive Sauerstoffspezies, —→ Stimulation, —→ Hemmung

Für die Behandlung von BT-474-Zellen mit dextranumhüllten Eisenoxidnanopartikeln wurde in der vorliegenden Arbeit eine mit zunehmender Nanopartikelkonzentration (1,5, 15, 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$) stärker werdende Steigerung der Expression von MRP 1 auf Proteinebene beobachtet, die bei einer Konzentration von 150 $\mu\text{g Fe/cm}^2$ mehr als das Doppelte des Kontrollniveaus betrug. Für MRP 3 wurde auf Proteinebene eine moderate, von der Nanopartikelkonzentration unabhängige, Steigerung der Expression auf 120 % beobachtet. Vergleichbare Analysen aus anderen Arbeitsgruppen liegen für MRP 1 und 3 nicht vor. Auch für den ältesten Vertreter der MDR-Proteine, P-Glycoprotein, sind nur wenige Untersuchungen zum Einfluss von ungekoppelten Eisenoxidnanopartikeln bekannt. Es wird beschrieben, dass sich die Expression von P-Glycoprotein unter dem Einfluss von magnetischen Nanopartikeln nicht ändert (Chen et al. 2008, Chen et al. 2009, Jiang et al. 2009). Direkte Effekte der verwendeten 50 nm großen Nanopartikel auf die RNA von MRP 1 und 3 als Erklärung für die auf

Proteinebene beobachteten Expressionssteigerungen erscheinen unwahrscheinlich, da zum einen Partikel mit einer Größe von mehr als 40 nm nicht in den Zellkern gelangen (Marano et al. 2010) und zum anderen keine Änderungen auf RNA-Ebene festgestellt wurden. Als mögliche molekulare Ursachen für die unter normothermen Bedingungen gefundene Hochregulation von MRP 1 und 3 auf Proteinebene können vor allem drei Wege diskutiert werden (siehe Abbildung 37 A): a) Eisen ist in der Lage die Expression des MDR-Proteins P-Glycoprotein zu stimulieren (Fang et al. 2010). Inwieweit dieser Mechanismus auch auf dextranumhüllte Nanopartikel und die Proteine MRP 1 und 3 übertragbar ist, muss durch Untersuchung der Wirkung von molekularem Eisen bzw. Eisenoxid auf die Expression von MRP 1 und 3 noch geklärt werden. b) Als zweiter Mechanismus kommt ein direkter Einfluss von Eisenoxidanopartikeln auf die Verlagerung von MRP 1 und 3 aus intrazellulären Speicherpools als Ursache für die gefundene Hochregulation von MRP 1 und 3 infrage (z.B. durch Aktivierung von für den zellulären Transport verantwortlichen Proteinen, siehe auch Mechanismen der hyperthermen Regulation S.91). c) Ein dritter denkbarer Regulationsmechanismus kann in der Beeinflussung der Stabilität von Proteinen durch Nanopartikel gesehen werden (Chen und Liao 2002, Cheng et al. 2009): Durch die Steigerung der Membranfluidität infolge der Einlagerung von Nanopartikeln bzw. deren Abbauprodukten in die Zellmembran könnte es zu einer Stabilisierung von MRP 1 und 3 kommen, was die unter normothermen Bedingungen gefundene Expressionssteigerung erklären könnte. Inwieweit parallel dazu die Funktion von MRP 1 und 3 beeinflusst wird, muss durch Funktionalitätstests, beispielsweise mit Calcein-AM, noch untersucht werden. Vergleichsweise wird für P-Glycoprotein eine mit einer Veränderung der Membranfluidität einhergehende Konformationsänderung diskutiert, die zu einer reduzierten Affinität zu ATP und folglich zum Funktionsverlust von P-Glycoprotein führt (Chen et al. 2009, Batrakova et al. 2001).

Das klinische Ziel der Behandlung mit Eisenoxidanopartikeln ist jedoch nicht die isolierte Gabe, sondern die Kombination mit Chemo- und/ oder Thermotherapie ist. Daher erscheint eine kombinierte Untersuchung besonders interessant. In Kombination mit einer 60minütigen Wärmebehandlung im Anschluss an die Behandlung von BT-474-Zellen mit Eisenoxidanopartikeln wurde ein Rückgang der Expression von MRP 1 bzw. 3 auf Kontrollniveau bei allen eingesetzten Konzentrationen beobachtet. Durch die Kombination mit einer 90minütigen Hyperthermie wurde eine deutliche Abnahme, die bei MRP 1 wesentlich stärker war, als bei MRP 3 und größer als die alleinige Hyperthermiebehandlung ausfiel. Im Gegensatz dazu wurden auf RNA-Ebene keine Expressionsänderungen von MRP

1 und 3 festgestellt. Vergleichbare Untersuchungen zu MRP 1 und 3 bzw. anderen MDR-Proteinen liegen bisher nicht vor. Hyperthermie (Wartenberg et al. 2005a), wie auch Nanopartikel führen zu einer Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehalts (Kuo 2009). Diese Eigenschaft gilt für metallische, wie auch für nichtmetallische Nanopartikel (Shubayev et al. 2009). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher noch nicht im Detail aufgeklärt. Unter normothermen Bedingungen (niedriges basales Level von ROS) könnte es durch die Nanopartikel zu einem moderaten Anstieg der ROS und damit zu einer Steigerung der Expression von MRP 1 und 3 kommen, während ein starker Anstieg von ROS unter hyperthermen Bedingungen (hohes basales Level von ROS) in einer Abnahme der Proteinexpression resultiert. Dieser Effekt wird durch Erhöhung der Hyperthermiedauer verstärkt. Als weiterer Regulationsmechanismus muss ferner beachtet werden, dass Proteine bei Bindung an Nanopartikel thermisch instabil sind (Fei und Perrett 2009), sodass dies den Abbau von MRP 1 und 3 beeinflussen könnten (siehe Abbildung 37 B).

Damit kann durch den Einsatz von Nanopartikeln unter hyperthermen Bedingungen eine Voraussetzung geschaffen werden, Chemotherapeutika erfolgreicher und zielgerichteter zu einzusetzen. Es können Effekte erzielt werden, für die bei alleiniger Hyperthermiebehandlung deutlich höhere Temperaturen bzw. eine deutlich längere Behandlungsdauer notwendig wären. Außerdem kann durch die zielgerichtete Applikation und die dadurch nur lokal induzierte Hyperthermie davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte auf Tumorzellen beschränkt bleiben, also physiologische Detoxifikationsmechanismen nicht gehemmt werden. Für die Evaluation der klinischen Relevanz dieser Beobachtung müssen weitere Untersuchungen bezüglich der Funktionalität von MRP 1 bzw. 3, sowie die molekularen Mechanismen, die den Beobachtungen zugrunde liegen, geführt werden.

Wie bereits ausgeführt, kam es nach der Behandlung von BT-474-Zellen mit Mitomycin C zu einer deutlichen Abnahme von MRP 1 und 3, während für Eisenoxidnanopartikel unter normothermen Bedingungen eine von der Partikelkonzentration abhängige Steigerung der Expression auf Protein-, nicht aber auf RNA-Ebene gezeigt werden konnte. Daraus ergibt sich die Frage, was passiert, wenn beide Modalitäten unter normothermen Bedingungen auf die Zelle einwirken. Nach der Behandlung von BT-474-Zellen mit Eisenoxidnanopartikeln (1,5, 15, 150 $\mu\text{g Fe/ cm}^2$) und der höchsten Mitomycin C – Konzentration (1,5 $\mu\text{g/cm}^2$) wurde eine von der partikelkonzentration unabhängige Abnahme von MRP 1 und MRP 3 auf etwa 70 % beobachtet. Ähnliche Analysen aus anderen Arbeitsgruppen sind bisher nicht bekannt. Aus Untersuchungen zum Einfluss von mit Chemotherapeutika gekoppelten Nanopartikeln auf P-

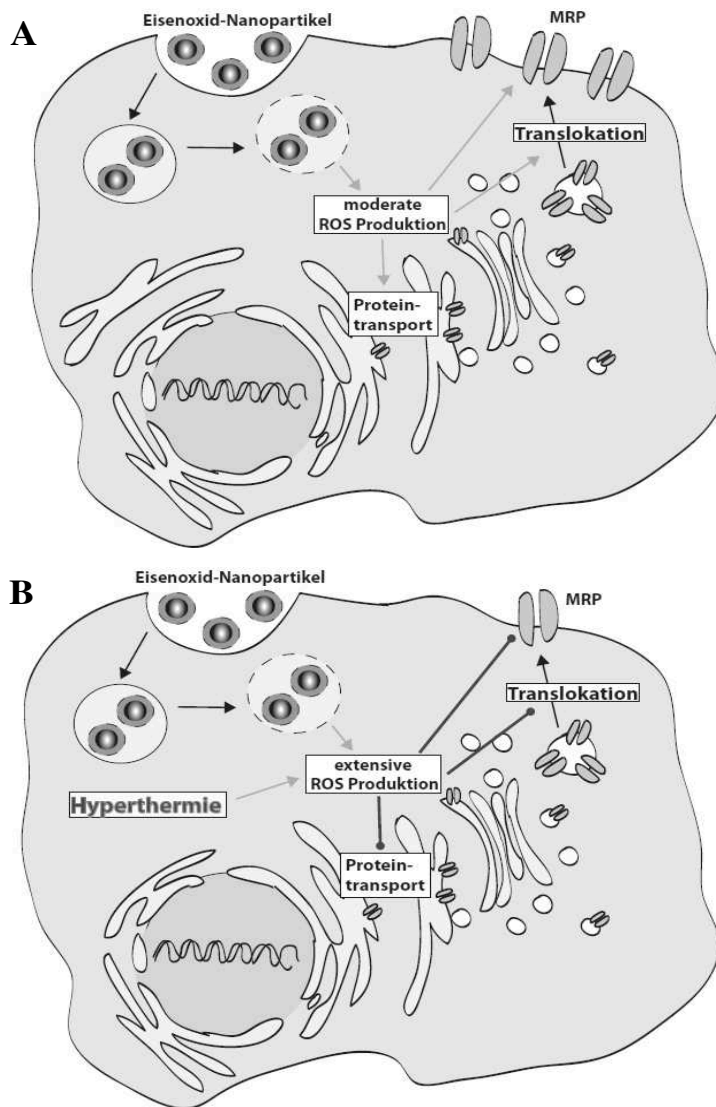





Abbildung 37: Möglicher Wirkmechanismus, der zu einer Expressionssteigerung von Multidrug Resistance assoziierten Proteinen (MRP, ) allein (A) und zu einer Expressionsabnahme in Kombination mit Hyperthermie (B) führen könnte; Grundlage ist die Annahme, dass niedrige ROS-Konzentrationen zu einer Steigerung, hohe ROS-Konzentrationen hingegen zu einer Abnahme von MRP führen; unter der alleinigen Einwirkung von Eisenoxidnanopartikeln wird eine moderate Produktion von ROS diskutiert, die folglich zu einer Steigerung der Expression von MRP 1 bzw. 3 führt; ferner werden nach Aufnahme der Eisenoxidnanopartikel in die Zielzelle direkt stabilisierende Effekte auf Membranproteine, sowie eine Steigerung der Verlagerung von MRP in die Membran diskutiert; unter der zusätzlichen Einwirkung von Hyperthermie wird die ROS-Produktion weiter gesteigert, sodass eine nun vorliegende extensive ROS-Produktion in einer Herunterregulation von MRP resultiert; Einzelheiten siehe Text; ROS, Reaktive Sauerstoffspezies;  Stimulation,  Hemmung

Glycoprotein gibt es Hinweise, dass eine Hemmung von MDR-Proteinen eintritt (Chen 2009a, Chen 2009b, Chen 2009c, Cheng 2009, Wang 2006, Jiang 2009): Jiang et al. (2009) konnten zeigen, dass mit Cisplatin, einem P-Glycoprotein inhibierenden Chemotherapeutikum, gekoppelte Eisenoxidnanopartikel zu einer deutlich stärkeren Abnahme von P-Glycoprotein als Cisplatin allein führen. Ferner wurde *in vivo* beobachtet, dass mit Daunorubicin gekoppelte Eisenoxidnanopartikel nur in P-Glycoprotein-positiven Tumoren zu einer

stärkeren Hemmung des Tumorwachstums im Vergleich zur alleinigen Gabe von Daunorubicin führen (Chen 2009b). In der vorliegenden Arbeit konnte im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Mitomycin C (0h Postinkubationszeit) keine deutliche Beeinflussung des auf Mitomycin C allein zurückzuführenden Effekts beobachtet werden. Daher kann vermutet werden, dass die in der Literatur für gekoppelte Nanopartikel beschriebene Verstärkung der Herunterregulation von MRP 1 und MRP 3 im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie auch auf die Kopplung zurückzuführen sein könnte. Da wir zwei unterschiedliche Wirkungen für Mitomycin C und Eisenoxidnanopartikel postulieren, kann darin eine mögliche Ursache des beobachteten Effekts liegen: Während für Eisenoxidnanopartikel eine kurzfristige Stabilisierung von MRP 1 bzw. 3 auf Proteinebene vermutet wird, könnte diese durch eine langfristige Beeinflussung der RNA infolge der Mitomycinbehandlung aufgehoben werden. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass die beobachtete Abnahme von MRP 1 und 3 von der Partikelkonzentration unabhängig ist und somit auf Mitomycin C zurückzuführen sein könnte. Um diese Frage abschließend zu klären, müsste das untersuchte Zeitfenster detaillierter betrachtet werden und Expressionsanalysen möglicherweise beteiligter Proteine nach kombinierter magnetischer Thermochemotherapie, z.B. mittels Immunoblotting, folgen.

Da das klinische Ziel der Einsatz von mit Mitomycin C gekoppelten Eisenoxidnanopartikeln unter hyperthermen Bedingungen (magnetische Hyperthermie) ist, erscheint es ferner als grundlegende Frage, wie sich die Expression von MRP 1 und 3 bei Kombination von Chemotherapie, magnetischen Nanopartikeln und Hyperthermie verhält. Da *in vivo* mit den magnetischen Nanopartikeln Wärme induziert werden soll, wurden *in vitro* zunächst die Eisenoxidnanopartikel für 22,5 Stunden inkubiert. Nach einer anschließenden 90minütigen Hyperthermiebehandlung und einer 24stündige Behandlung mit 1,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C wurde eine Verstärkung der schon unter normothermen Bedingungen beobachteten Abnahme (< 60 %) von MRP 1 und 3 auf Proteinebene beobachtet. Da bei Kombination von Hyperthermie und Mitomycin C allein eine deutlich stärkeren Abnahme (< 30 %) beobachtet wurde, lässt sich vermuten, dass bei den unter Hyperthermie veränderten zytosolischen pH- und Ionenverhältnissen Mitomycin C von den Eisenoxidnanopartikeln bzw. deren Abbauprodukten adsorbiert wird und dadurch den Kern in geringerer Konzentration als bei alleiniger Applikation erreichen kann, was den Synergismus von Mitomycin C und Hyperthermie deutlich abschwächt. Aufschluss über den genauen molekularen Mechanismus und die optimal zu kombinierenden Konzentrationen der Einzelmodalitäten können weitere molekulare Untersuchungen geben. Ferner muss die Frage nach der Funktionalität von MRP 1

und 3 im Rahmen dieser trimodalen Therapie, beispielsweise durch den Einsatz eines Calcein-AM-Funktionalitätstests, geklärt werden.

Nachdem in der vorliegenden Arbeit durch Hyperthermie allein, wie auch in Kombination mit Mitomycin C und Eisenoxidnanopartikeln eine deutliche Abnahme von MRP 1 und MRP 3 insbesondere auf Proteinebene beobachtet wurde, stellen sich insbesondere zwei Fragen: a) Könnte eine Vitalitätsabnahme die Ursache für die gefundene Expressionsabnahme sein? b) Welche Konsequenz hat die beobachtete Expressionsabnahme von MRP 1 und MRP 3 für die Vitalität von BT-474-Zellen?

Zur Klärung der Frage, ob ein apoptotischer Prozess und damit eine Vitalitätsabnahme ursächlich für die beobachtete Abnahme der Expression von MRP-Proteinen nach Behandlung mit Hyperthermie, Mitomycin C und Eisenoxidnanopartikeln sein könnte, muss ein Blick auf das Verhalten von MDR-Proteinen unter apoptotischen Bedingungen geworfen werden. Für P-Glycoprotein, den am besten charakterisierten Vertreter der MDR-Familie, sind proapoptotische Eigenschaften bekannt (Pallis et al. 1997). Überträgt man diese Beobachtung auf MRP 1 und MRP 3, so müsste es im Rahmen eines apoptotischen Geschehens eher zu einer Hochregulation anstelle der beobachteten Herunterregulation kommen. Daher erscheinen vitalitätseinschränkende bzw. apoptotische Geschehnisse als ursächliche Faktoren für die beobachtete Expressionsabnahme unwahrscheinlich. Eine Vitalitätsabnahme als Ursache für die gefundene Expressionsabnahme von MRP 1 und MRP 3 erscheint außerdem unwahrscheinlich, da die Expressionsanalysen ausschließlich mit vitalen Zellen durchgeführt wurden und von allen Proben identische Mengen Gesamtprotein bzw. Gesamt-RNA eingesetzt wurden. Damit kann die Expressionsabnahme eher auf molekulare Mechanismen als auf eine verminderte Vitalität der Zellen zurückgeführt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dextranumhüllte Eisenoxidnanopartikel in den eingesetzten Konzentrationen selbst keine Toxizität gegenüber Zellen in Kultur zeigen. Damit konnten die Ergebnisse aus der Literatur (Zhang et al. 2003, Cheng et al. 2009) bestätigt werden. Durch die Behandlung mit $0,15\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C wurde eine 60,4 %ige, nach Behandlung mit $1,5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eine 42,1 %ige Vitalitätseinschränkung von BT-474-Zellen beobachtet. Durch die kombinierte Behandlung von Eisenoxidnanopartikeln ($1,5$, 15 und $150\mu\text{g Fe}/\text{cm}^2$) mit der am stärksten vitalitätseinschränkenden Mitomycin C – Konzentration ($1,5\mu\text{g}/\text{cm}^2$) wurde die Toxizität im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit $1,5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ Mitomycin C nicht verändert. Hyperthermie für eine Dauer von 15 bzw. 90 min zeigte keine vitalitätseinschränkende Wirkung und beeinflusste die Toxizität von Mitomycin

C und Eisenoxidnanopartikeln nicht. Damit konnte für die in der vorliegenden Arbeit genutzten Bedingungen die aus der Literatur bekannte Beobachtung bestätigt werden, dass eine hypertherme Behandlung bei 43 °C bis 120 min selbst keine direkt zytotoxische Wirkung hat (van der Heijden et al. 2005, Hildebrandt und Wust 2007a). In der vorliegenden Arbeit konnten keine additiven Effekte von Hyperthermie und Mitomycin C gezeigt werden. Gegensätzlich dazu sind für die Kombination von Hyperthermie und Chemotherapie in der Literatur additive Wirkungen *in vitro* und *in vivo* bekannt (Herman et al. 1990, van der Heijden et al. 2005). Da der additive Effekt in besonderem Maße nicht nur vom Chemotherapeutikum, sondern auch von der untersuchten Zelllinie abhängt (Herman et al. 1990, van der Heijden et al. 2005), besteht die Möglichkeit, dass BT-474-Zellen kein additives Verhalten von Mitomycin C und Wärme zeigen. Vergleichbare Untersuchungen liegen nicht vor. Eine weitere mögliche Ursache könnte darin liegen, dass die Expression von MDR-Proteinen insbesondere durch eine chemotherapeutische Behandlung stimuliert wird. In der Literatur wird daher mit sogenannten sensitiven Zellen, also Zellen die durch eine chemotherapeutische Selektion den zu untersuchenden Transporter überexprimieren, gearbeitet (Cole et al. 1992, Cuvier et al. 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen mit Zellen gearbeitet, die zuvor nicht unter einer Chemotherapie selektioniert wurden, da das Ziel eine primäre Wärmebehandlung von nicht vorbehandelten Patienten ist. Daher kann als zweite mögliche Ursache eine zu geringe basale Expression von MRP 1 bzw. 3 in den untersuchten nativen BT-474-Zellen diskutiert werden, sodass eine Abnahme dieser Proteine noch keine Änderung in der Akkumulation verschiedener Zytostatika bewirken konnte.

In der vorliegenden Arbeit konnte damit gezeigt werden, dass dem Einsatz von Hyperthermie, Mitomycin C und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln im Rahmen einer multivalenten magnetischen Wärmebehandlung von Brustkrebs *keine Hochregulation* von MRP 1 und 3 gegenübersteht. Mit der Hemmung dieser Effluxtransporter kann die Hoffnung verknüpft werden, Chemotherapeutika effektiver, niedriger dosiert und nebenwirkunsärmer zu applizieren und die Tumorzelle selektiver zu zerstören. Da für die klinische Anwendung mit Mitomycin C gekoppelte Eisenoxidnanopartikel im Magnetwechselfeld eingesetzt werden sollen, erscheint das Verhalten von MRP 1 und 3 unter dem Einfluss von konjugierten Nanopartikeln, sowie unter magnetischer Hyperthermie als nächster Schritt in Zukunft von besonderem Interesse.

7 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer Herunterregulation von MRP 1 und MRP 3 *in vitro* unter dem Einfluss von Hyperthermie und Mitomycin C, sowie in Kombination mit magnetischen Nanopartikeln kommt. Durch die Kombination von Mitomycin C bzw. Eisenoxidnanopartikeln mit Hyperthermie wurde eine deutlich stärkere Abnahme von MRP 1 und MRP 3 als bei alleiniger Gabe erreicht. Damit können hemmende Effekte auf die Expression von MRP 1 und 3 erzielt werden, für die bei alleiniger Hyperthermiebehandlung deutlich höhere Temperaturen bzw. eine deutlich längere Behandlungsdauer notwendig wären. Außerdem konnte gezeigt werden, dass mit der magnetischen Hyperthermie nicht nur die Hoffnung der zielgerichteten Erwärmung und selektiven chemotherapeutischen Behandlung von Tumorgewebe verknüpft werden kann, sondern auch eine Chance gegeben ist, die Multidrug Resistance zu überwinden und damit Chemotherapeutika möglicherweise effektiver und zielgerichteter einzusetzen. Einer multivalenten magnetischen Wärmebehandlung stehen *in vitro* folglich kein verstärkter Efflux durch MRP 1 und 3 gegenüber.

Um die Mechanismen, die zu den beobachteten Einflüssen auf die Multidrug Resistance assoziierten Proteine MRP 1 und MRP 3 führen, genauer zu verstehen, müssen weitere molekularbiologische Untersuchungen folgen. Für die Evaluation der klinischen Relevanz der Beobachtungen erscheint von großem Interesse, ob es neben der Expressionsabnahme auch zu einer Minderung der Funktionalität von MRP 1 und MRP 3 unter Hyperthermie, Mitomycin C und magnetischen Nanopartikeln kommt. Ferner ist es interessant, welchen Einfluss ein Magnetwechselfeld auf die Expression und Funktionalität von MDR-Proteinen ausübt. Da MDR-Proteine einem streng kontrollierten Regulationsmechanismus unterliegen, gilt es später zu klären, wie sich diese Transporter unter dem Einfluss von Hyperthermie, Chemotherapie und magnetischen Eisenoxidnanopartikeln *in vivo* verhalten.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Alakhova DY, Rapoport NY, Batrakova EV, Timoshin AA, Li S, Nicholls D, Alakhov VY, Kabanov AV. 2009. Differential metabolic responses to pluronic in MDR and non-MDR cells: a novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers. *J Control Release*, 142:89-100.
- Alexiou C, Arnold W, Klein RJ, Parak FG, Hulin P, Bergemann C, Erhardt W, Wagenpfeil S, Lubbe AS. 2000. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res*, 60 (23):6641-6648.
- Almquist KC, Loe DW, Hipfner DR, Mackie JE, Cole SP, Deeley RG. 1995. Characterization of the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP) in drug-selected and transfected human tumor cell. *Cancer Res*, 55 (1):102-110.
- Bakos E, Homolya L. 2007. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch*, 453 (5):621-641.
- Batrakova EV, Li S, Vinogradov SV, Alakhov VY, Miller DW, Kabanov AV. 2001. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J Pharmacol Exp Ther*, 299:483-493.
- Baust JG, Gage AA, Robilotto AT, Baust JM. 2009. The pathophysiology of thermoablation: optimizing cryoablation. *Curr Opin Urol*, 19 (2):127-132.
- Borst P, de Wolf C, van de Wetering K. 2007. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflugers Arch*, 453 (5):661-673.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem*, 180 (1):136-139.
- Cai Y, Lu J, Miao Z, Lin L, Ding J. 2007. Reactive oxygen species contribute to cell killing and P-glycoprotein downregulation by salvicine in multidrug resistant K562/A02 cells. *Cancer Biol Ther*, 6:1794-1799.
- Caron RM, Hamilton JW. 1998. Developmentally specific effects of the DNA cross-linking agent mitomycin C on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in vivo: correlation with changes in chromatin structure within the promoter region of the gene. *J Biochem Mol Toxicol*, 12:325-337.
- Chen B, Sun Q, Wang X, Gao F, Dai Y, Yin Y, Ding J, Gao C, Cheng J, Li J, Sun X, Chen N, Xu W, Shen H, Liu D. 2008. Reversal in multidrug resistance by magnetic nanoparticle of Fe₃O₄ loaded with adriamycin and tetrandrine in K562/A02 leukemic cells. *Int J Nanomedicine*, 3 (2):277-286.
- Chen B, Cheng J, Wu Y, Gao F, Xu W, Shen H, Ding J, Gao C, Sun Q, Sun X, Cheng H, Li G, Chen W, Chen N, Liu L, Li X, Wang X. 2009. Reversal of multidrug resistance by magnetic Fe₃O₄ nanoparticle copolymerizing daunorubicin and 5-bromotetrandrine in xenograft nude-mice. *Int J Nanomedicine*, 4:73-78.
- Chen D, Liao M. 2002. Preparation and characterization of YADH-bound magnetic nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16:283-291.
- Cheng J, Wu W, Chen BA, Gao F, Xu W, Gao C, Ding J, Sun Y, Song H, Bao W, Sun X, Xu C, Chen W, Chen N, Liu L, Xia G, Li X, Wang X. 2009. Effect of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ and 5-bromotetrandrine on reversal of multidrug resistance in K562/A02 leukemic cells. *Int J Nanomedicine*, 4:209-216.

- Cherukuri P, Glazer ES, Curley SA. 2010. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 62 (3):339-345.
- Chin KV, Tanaka S, Darlington G, Pastan I, Gottesman MM. 1990. Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J Biol Chem*, 265 (1):221-226.
- Clasen S, Pereira PL. 2007. Combined therapies including interventional radiology. *Radiologe*, 47 (12):1072, 1074-1082.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM, Deeley RG. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258 (5088):1650-1654.
- Coley HM. 2008. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev*, 34 (4):378-390.
- Cuvier C, Roblot-Treupel L, Millot JM, Lizard G, Chevillard S, Manfait M, Couvreur P, Poupon MF. 1992. Doxorubicin-loaded nanospheres bypass tumor cell multidrug resistance. *Biochem Pharmacol*, 44 (3):509-517.
- Dennis CL, Jackson AJ, Borchers JA, Hoopes PJ, Strawbridge R, Foreman AR, van Lierop J, Gruttner C, Ivkov R. 2009. Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia. *Nanotechnology*, 20 (39)
- Dutz R. 2008. Nanopartikel in der Medizin. Magnetische Eisenoxid-Nanopartikel für intrakorporale Erwärmungsanwendungen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität,
- Fang D, Bao Y, Li X, Liu F, Cai K, Gao J, Liao Q. 2010. Effects of iron deprivation on multidrug resistance of leukemic K562 cells. *Chemotherapy*, 56 (1):9-16.
- Fei L, Perrett S. 2009. Effect of nanoparticles on protein folding and fibrillogenesis. *Int J Mol Sci*, 10 (2):646-655.
- Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. 2001. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 8.10
- Gutmann DA, Ward A, Urbatsch IL, Chang G, van Veen HW. 2009. Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1. *Trends Biochem Sci*, 35 (1):36-42.
- Hager E. 2003. Historische Entwicklung der komplementären Krebstherapie. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie*, 35:168–178
- Hall MD, Handley MD, Gottesman MM. 2009. Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. *Trends Pharmacol Sci*, 30 (10):546-556.
- Hamilton JW, Kaltreider RC, Bajenova OV, Ihnat MA, McCaffrey J, Turpie BW, Rowell EE, Oh J, Nemeth MJ, Pesce CA, Lariviere JP. 1998. Molecular basis for effects of carcinogenic heavy metals on inducible gene expression. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 4:1005-1015.
- Han J, Singh AK. 2004. Rapid protein separations in ultra-short microchannels: microchip sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *J Chromatogr A*, 1049 (1-2):205-209.
- Hayes MC, Birch BR, Cooper AJ, Primrose JN. 2001. Cellular resistance to mitomycin C is associated with overexpression of MDR-1 in a urothelial cancer cell line (MGH-U1). *BJU Int*, 87 (3):245-250.
- Herman TS, Teicher BA, Holden SA. 1990. Trimodality therapy (drug/hyperthermia/radiation) with BCNU or mitomycin C. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 18 (2):375-382.
- Hildebrandt B, Wust P. 2007a. Interactions between hyperthermia and cytotoxic drugs. *Cancer Treat Res*, 134:185-193.
- Hildebrandt B, Wust P. 2007b. The biologic rationale of hyperthermia. *Cancer Treat Res*, 134:171-184.

- Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R, Riess H. 2002. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol*, 43 (1):33-56.
- Hilger I, Andra W, Hergt R, Hiergeist R, Kaiser WA. 2005. Magnetic thermotherapy of breast tumors: an experimental therapeutic approach. *Rofo*, 177 (4):507-515.
- Hilger I, Andra W, Hergt R, Hiergeist R, Schubert H, Kaiser WA. 2001. Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: in vitro and in vivo studies in human cadavers and mice. *Radiology*, 218 (2):570-575.
- Hosten N, Stier A, Weigel C, Kirsch M, Puls R, Nerger U, Jahn D, Stroszczynski C, Heidecke CD, Speck U. 2003. Laser-induced thermotherapy (LITT) of lung metastases: description of a miniaturized applicator, optimization, and initial treatment of patients. *Rofo*, 175 (3):393-400.
- Huang XZ, Wang J, Huang C, Chen YY, Shi GY, Hu QS, Yi J. 2008. Emodin enhances cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in prostate cancer cells: the mechanisms involve ROS-mediated suppression of multidrug resistance and hypoxia inducible factor-1. *Cancer Biol Ther*, 7 (3):468-475.
- Ihnat MA, Lariviere JP, Warren AJ, La Ronde N, Blaxall JR, Pierre KM, Turpie BW, Hamilton JW. 1997. Suppression of P-glycoprotein expression and multidrug resistance by DNA cross-linking agents. *Clin Cancer Res*, 3:1339-1346.
- Issels RD. 2008. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer*, 44 (17):2546-2554.
- Jiang Z, Chen BA, Xia GH, Wu Q, Zhang Y, Hong TY, Zhang W, Cheng J, Gao F, Liu LJ, Li XM, Wang XM. 2009. The reversal effect of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles loaded with cisplatin on SKOV3/DDP ovarian carcinoma cells. *Int J Nanomedicine*, 4:107-114.
- Juliano RL, Ling V. 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*, 455 (1):152-162.
- Krishna R, Mayer LD. 2000. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*, 11 (4):265-283.
- Kruh GD, Belinsky MG, Gallo JM, Lee K. 2007. Physiological and pharmacological functions of Mrp2, Mrp3 and Mrp4 as determined from recent studies on gene-disrupted mice. *Cancer Metastasis Rev*, 26 (1):5-14.
- Kubo K. 1995. Effect of incubation of solutions of proteins containing dodecyl sulfate on the cleavage of peptide bonds by boiling. *Anal Biochem*, 225 (2):351-353.
- Kuo MT. 2009. Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 11 (1):99-133.
- Kuo MT, Bao J, Furuichi M, Yamane Y, Gomi A, Savaraj N, Masuzawa T, Ishikawa T. 1998. Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. *Biochem Pharmacol*, 55 (5):605-615.
- Kyhse-Andersen J. 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10 (3-4):203-209.
- Latorre M, Rinaldi C. 2009. Applications of magnetic nanoparticles in medicine: magnetic fluid hyperthermia. *P R Health Sci J*, 28 (3):227-238.
- Le Renard PE, Buchegger F, Petri-Fink A, Bosman F, Rufenacht D, Hofmann H, Doelker E, Jordan O. 2009. Local moderate magnetically induced hyperthermia using an implant formed in situ in a mouse tumor model. *Int J Hyperthermia*, 25 (3):229-239.
- Lehner I, Niehof M, Borlak J. 2003. An optimized method for the isolation and identification of membrane proteins. *Electrophoresis*, 24 (11):1795-1808.

- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*, 204 (3):216-237.
- Li L, Xu J, Min T, Huang W. 2006. Up-regulation of P-glycoprotein expression by catalase via JNK activation in HepG2 cells. *Redox Rep*, 11 (4):173-178.
- Lisy M. 2003. Untersuchungen von Komponenten des 5-Lipoxygenase Stoffwechselweges in humanen B-Lymphozyten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität,
- Liu FS. 2009. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy--a quick review. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 48 (3):239-244.
- Liu Q, Shuhendler A, Cheng J, Rauth AM, O'Brien P, Wu XY. 2009. Cytotoxicity and mechanism of action of a new ROS-generating microsphere formulation for circumventing multidrug resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 121 (2):323-333.
- Liu Y, Peng H, Zhang JT. 2005. Expression profiling of ABC transporters in a drug-resistant breast cancer cell line using AmpArray. *Mol Pharmacol*, 68 (2):430-438.
- Liu Y, Cho CW, Yan X, Henthorn TK, Lillehei KO, Cobb WN, Ng KY. 2001. Ultrasound-Induced hyperthermia increases cellular uptake and cytotoxicity of P-glycoprotein substrates in multi-drug resistant cells. *Pharm Res*, 18 (9):1255-1261.
- Lund R, Leth-Larsen R, Jensen ON, Ditzel HJ. 2009. Efficient isolation and quantitative proteomic analysis of cancer cell plasma membrane proteins for identification of metastasis-associated cell surface markers. *J Proteome Res*, 8 (6):3078-3090.
- Mahnken A, Bruners P, Günther W. 2008. Techniken der interventionellen Tumorthherapie. *Dtsch Arztebl*, 105 (38):646-653.
- Maitra R, Shaw CM, Stanton BA, Hamilton JW. 2001a. Increased functional cell surface expression of CFTR and DeltaF508-CFTR by the anthracycline doxorubicin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280:C1031-C1007.
- Maitra R, Halpin PA, Karlson KH, Page RL, Paik DY, Leavitt MO, Moyer BD, Stanton BA, Hamilton JW. 2001b. Differential effects of mitomycin C and doxorubicin on P-glycoprotein expression. *Biochem J*, 355:617-624.
- Mannhalter C, Koizar D, Mitterbauer G. 2000. Evaluation of RNA isolation methods and reference genes for RT-PCR analyses of rare target RNA. *Clin Chem Lab Med*, 38 (2):171-177.
- Marano F, Hussain S, Rodrigues-Lima F, Baeza-Squiban A, Boland S. 2010. Nanoparticles: molecular targets and cell signalling. *Arch Toxicol*,
- Mohamed F, Stuart OA, Glehen O, Urano M, Sugarbaker PH. 2006. Optimizing the factors which modify thermal enhancement of melphalan in a spontaneous murine tumor. *Cancer Chemother Pharmacol*, 58 (6):719-724.
- Moriyama-Gonda N, Igawa M, Shiina H, Wada Y. 1998. Heat-induced membrane damage combined with adriamycin on prostate carcinoma PC-3 cells: correlation of cytotoxicity, permeability and P-glycoprotein or metallothionein expression. *Br J Urol*, 82 (4):552-559.
- Ngoka LC. 2008. Sample prep for proteomics of breast cancer: proteomics and gene ontology reveal dramatic differences in protein solubilization preferences of radioimmunoprecipitation assay and urea lysis buffers. *Proteome Sci*, 6 (30)
- Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, Bentzen SM. 1995. Randomised trial of hyperthermia as adjuvant to radiotherapy for recurrent or metastatic malignant melanoma. *European Society for Hyperthermic Oncology. Lancet*, 345 (8949):540-543.
- Pallis M, Zhu YM, Russell NH. 1997. Bcl-x(L) is heterogenously expressed by acute myeloblastic leukaemia cells and is associated with autonomous growth in vitro and with P-glycoprotein expression. *Leukemia*, 11 (7):945-949.

- Peng XH, Qian X, Mao H, Wang AY, Chen ZG, Nie S, Shin DM. 2008. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Int J Nanomedicine*, 3 (3):311-321.
- Pertoft H. 2000. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Methods*, 44 (1-2):1-30.
- Rajagopal A, Simon SM. 2003. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol Biol Cell*, 14 (8):3389-3399.
- Rehm H, Letzel T. 2010. *Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics*. 6te Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Roti Roti JL. 2007. Heat-induced alterations of nuclear protein associations and their effects on DNA repair and replication. *Int J Hyperthermia*, 23 (1):3-15.
- Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G, Varadi A. 2006. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev*, 86 (4):1179-1236.
- Schlemmer M, Lindner LH, Abdel-Rahman S, Issels RD. 2004. Principles, technology and indication of hyperthermia and part body hyperthermia. *Radiologe*, 44 (4):301-309.
- Schrenk D, Baus PR, Ermel N, Klein C, Vorderstemann B, Kauffmann HM. 2001. Up-regulation of transporters of the MRP family by drugs and toxins. *Toxicol Lett*, 120 (1-3):51-57.
- Seeger MA, van Veen HW. 2009. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1794 (5):725-737.
- Shubayev VI, Pisanic TR, 2nd, Jin S. 2009. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv Drug Deliv Rev*, 61 (6):467-477.
- Simonian MH, Smith JA. 2006. Spectrophotometric and colorimetric determination of protein concentration. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 10.1A
- Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. 2008. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc)*, 73 (5):592-604.
- Tomasz M, Palom Y. 1997. The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. *Pharmacol Ther*, 76:73-87.
- van der Heijden AG, Verhaegh G, Jansen CF, Schalken JA, Witjes JA. 2005. Effect of hyperthermia on the cytotoxicity of 4 chemotherapeutic agents currently used for the treatment of transitional cell carcinoma of the bladder: an in vitro study. *J Urol*, 173 (4):1375-1380.
- van der Zee J. 2002. Heating the patient: a promising approach? *Ann Oncol*, 13 (8):1173-1184.
- van Esser S, van den Bosch MA, van Diest PJ, Mali WT, Borel Rinkes IH, van Hillegersberg R. 2007. Minimally invasive ablative therapies for invasive breast carcinomas: an overview of current literature. *World J Surg*, 31 (12):2284-2292.
- Vellonen KS, Mannermaa E, Turner H, Hakli M, Wolosin JM, Tervo T, Honkakoski P, Urtti A. 2010. Effluxing ABC transporters in human corneal epithelium. *J Pharm Sci*, 99 (2):1087-1098.
- Wang X, Zhang R, Wu C, Dai Y, Song M, Gutmann S, Gao F, Lv G, Li J, Li X, Guan Z, Fu D, Chen B. 2007. The application of Fe₃O₄ nanoparticles in cancer research: a new strategy to inhibit drug resistance. *J Biomed Mater Res A*, 80 (4):852-860.
- Ward WW, Fastiggi RJ. 1972. Binding of EDTA to DEAE-cellulose and its interference with protein determinations. *Anal Biochem*, 50 (1):154-162.
- Wartenberg M, Ling FC, Schallenberg M, Baumer AT, Petrat K, Hescheler J, Sauer H. 2001. Down-regulation of intrinsic P-glycoprotein expression in multicellular prostate tumor spheroids by reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 276 (20):17420-17428.
- Wartenberg M, Gronczynska S, Bekhite MM, Saric T, Niedermeier W, Hescheler J, Sauer H. 2005a. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in

- multicellular prostate tumor spheroids by hyperthermia and reactive oxygen species. *Int J Cancer*, 113 (2):229-240.
- Wartenberg M, Hoffmann E, Schwindt H, Grunheck F, Petros J, Arnold JR, Hescheler J, Sauer H. 2005b. Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids. *FEBS Lett*, 579 (20):4541-4549.
- Wei HM, Guo KY, Mei JZ, Chang H, Song CY, Deng L, Niu XQ. 2007. Effect of hyperthermia in combination with chemotherapy on K562/AO2 cells in vitro. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 15:724-728.
- Wong HL, Bendayan R, Rauth AM, Xue HY, Babakhanian K, Wu XY. 2006. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. *J Pharmacol Exp Ther*, 317 (3):1372-1381.
- Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. 2002. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol*, 3 (8):487-497.
- Wust P, Gneveckow U, Johannsen M, Bohmer D, Henkel T, Kahmann F, Sehouli J, Felix R, Ricke J, Jordan A. 2006. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy--feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int J Hyperthermia*, 22 (8):673-685.
- Zhang JT, Ling V. 1995. Involvement of cytoplasmic factors regulating the membrane orientation of P-glycoprotein sequences. *Biochemistry*, 34 (28):9159-9165.
- Zhang JT, Chong CH. 1996. Co-translational effects of temperature on membrane insertion and orientation of P-glycoprotein sequences. *Mol Cell Biochem*, 159 (1):25-31.
- Zhang P, Wang D, Zheng G. 2003. Reversal effect of hyperthermia on multidrug resistant phenomena [Abstract]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 21 (2):127-129.
- Zhou SF. 2008. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*, 38:802-832.
- Ziemann C, Burkle A, Kahl GF, Hirsch-Ernst KI. 1999. Reactive oxygen species participate in *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis*, 20 (3):407-414.

9 Anhang

9.1 Tabellen

Tabelle 20: Optimierungsschritte der Immunodetektion von MRP 1 in MCF-7-Zellen; dargestellt sind die Optimierungsschritte mit dem jeweiligen Ergebnis (X, Durchführung nach Optimierung)

Vorgang	Durchführung	Ergebnis
Western Blot		
Äquilibrieren von Gel und Membran	jeweils 15 min in Aqua bidest.	kein Effekt
Dauer und Stromstärke	1 h 30 min bei 114 mA 2 h bei 130 mA	<i>Ausgangssituation</i> Banden des Proteinstandards bereits auf Filterpapier
	1 h 40 min bei 130 mA	vollständiger Proteintransfer
Durchführung der Immunodetektion		
Kipp- / Rollermischer Schüttelinkubator	Falconröhrchen Gelfärbeschale	<i>Ausgangssituation</i> runde schwarze Flecken, v.a. an Rändern der Membran
Taumelmischer	Gelfärbeschale	keine Flecken
Blocken und anschließendes Waschen der Membran		
Blocklösung (in Waschpuffer)	5 % Milchpulver 5 % BSA 1 fach Roti-Block, 1 fach Roti-Block, gefiltert	<i>Ausgangssituation</i> weiße Proteinbanden kleine schwarze Punkte auf Membran keine Flecken/ Punkte
Blockdauer	über Nacht (4°C) 1 h (22°C) 2 h (22°C)	<i>Ausgangssituation</i> kein Effekt kein Effekt
Waschlösung (in Waschpuffer)	1% Milchpulver 1% BSA 0,1 fach Roti-Block	<i>Ausgangssituation</i> weiße Proteinbanden gute Banden
Waschdauer	3 x 5 min 5 x 5 min	<i>Ausgangssituation</i> kein Effekt
Antikörperbehandlung und Immunodetektion		
MRP 1 – Primärantikörper	<i>MRPm5</i> (Abcam; Cambridge, UK) <i>clone QCRL-1</i> (Sigma-Aldrich GmbH; München)	<i>Ausgangssituation</i> keine Flecken
Sekundärantikörper-verdünnung	1 : 1 000 1 : 10 000 1 : 2 500	<i>Ausgangssituation</i> keine Banden gute Signalstärke
Zusätzliche Behandlung der Membran		
Hochsalzwaschpuffer	3 x 10 min vor der Immunodetektion	Aufhellen des Hintergrundes, Abschwächen der Banden
Strippen der Membran	50 min 55°C 20 min 55°C	keine Banden mehr detektierbar; bei erneuter Antikörperinkubation schwächeres Signal bei 50 min Inkubation

9.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben. An erster Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Ingrid Hilger für die Möglichkeit bedanken, in Ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren. Außerdem möchte ich Ihr für die umfassende Betreuung, die fachlichen Diskussionen, Ratschläge und Hilfestellungen danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Melanie Kettering bedanken, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mir fachlich bei der Erarbeitung meiner Dissertation, aber auch persönlich mit guten Ideen stets zur Seite stand, mich immer wieder ermutigt hat, Lösungen zu suchen und mir während meiner Promotionzeit besonders ans Herz gewachsen ist.

Für die herzliche Aufnahme, große Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft, die mir von allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie entgegengebracht wurde, möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken. Ohne die „guten Seelen“ der Arbeitsgruppe, Brigitte Maron, Susann Burgold, Yvonne Heyne und Doreen May wären die Versuche nicht in dieser Weise verwirklicht gewesen. Ein besonderer Dank gilt Dipl.-Biochemikerin Franziska Hamann, die jederzeit für jedes Problem eine Lösung und für jede Frage die passende Antwort bereit hatte. Ein großer Dank für die persönliche Motivation und fachliche Unterstützung gilt auch Dipl.-Biochemikerin Ines Müller. Bedanken möchte ich mich auch bei Dipl.-Ingenieur Christian Pepke für die Hilfe aus dem Computerchaos und bei all den anderen, die hier unerwähnt geblieben sind. Bedanken möchte ich mich auch bei Katrin Hornung aus der Arbeitsgruppe Herz- und Thoraxchirurgie für die Unterstützung bei der Durchführung der Durchflusszytometrie.

Nicht vergessen will ich meine Mitstreiter(innen) Susanne Dietrich, Berit Schlothauer, Noemi Freise, Miriam Schäfer, Sylvia Paprotzki, Tom Schröter und Hanne Kempe, die mir stets aufmunternd zur Seite standen und meine Arbeit mit vielen wertvollen Ratschlägen bereichert haben. Ein besonderer Dank gilt auch Danny Kupka für die viele Mühe um meine Grafiken.

Nicht zuletzt will ich meiner Familie danken, die immer für mich da war und mir Kraft gegeben hat, Probleme hinter mir zu lassen und meine Ziele zu verwirklichen.

9.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Franke
 Vorname: Karolin
 Geburtsort: Saalfeld/Saale
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Religion: Evangelisch-Lutherisch

Studium

10/2006-11/2013 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
 10/2006-11/2013 Stipendiatin des Evangelischen Studienwerkes Villigst e.V.
 06/2009-02/2011 Dissertation am Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie Jena, Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie
 09.09.2008 1. Staatsexamen
 13.11.2013 2. Staatsexamen
 28.11.2013 Approbation als Ärztin

Schulbildung

1993 – 1997 Grundschule Probstzella
 1997 – 2003 Regelschule Gräfenenthal/ Unterloquitz
 Abschluss: Realschulabschluss
 2003 – 2006 Berufliches Gymnasium Rudolstadt
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 09.02.2011

Karolin Franke